Franck TRAVERS

PARIJS

1972

COMPORTEMENT DE BIOPOLYMERES HELICOÏDAUX EN PHASE HYDRO-ORGANIQUE A BASSE TEMPERATURE

UNIVERSITE PARIS VII

-=-=-=-=-=-

TRAVERS FRANCK

Thèse de DOCTORAT-ES-SCIENCES PHYSIQUES

Sujet : COMPORTEMENT DE BIOPOLYMERES HELICOIDAUX EN PHASE HYDRO-ORGANIQUE A BASSE TEMPERATURE.

-=-=-=-=-=-=-=-

Soutenance le 4 Juillet 1972

Jury : M. F. CHAPEVILLE — Président

M. M. GOLDBERG — Examinateur

M. P. DOUZOU — Examinateur

M. A.M. MICHELSON — Invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes parents.....

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur DOUZOU qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a enthousiasmé par sa conception de la recherche. Il m'a confié le sujet de ce travail qu'il n'a cessé de suivre et d'orienter avec compétence et dynamisme tout en veillant attentivement à ma formation de chercheur.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à Monsieur MICHELSON qui a posé les problèmes, suggéré les expériences, animé les discussions relatives aux polynucleotides avec une inégalable compétence qui a suscité mon admiration.

J'exprime ma respectueuse reconnaissance à Monsieur le Professeur CHAPEVILLE qui a bien voulu présider le jury ainsi que Monsieur le Professeur GOLDBERG qui a accepté de juger mon travail après m'avoir fait bénéficier de discussions et conseils.

Je remercie chaleureusement Messieurs BALNY et HUI BON HOA qui ont facilité mes débuts au Laboratoire aussi bien par leurs conseils que par leur camaraderie.

Je remercie également M^{lles} DEBEY et COUPECHOUX pour leur collaboration à certaines parties de ce travail.

M^{me} GARDERE, M^{lle} PIERRE et le personnel de l'Institut de Biologie Physico-Chimique m'ont aidé matériellement avec un dévouement dont je les remercie.

INTRODUCTION

L'expérimentation des biopolymères dans des solutions hydro-organiques, n'a eu par le passé que des applications assez limitées par le fait que la présence du solvant organique miscible à l'eau altère leur conformation.

Cette altération est attribuée aux modifications de constante dielectrique, de contenu ionique et d'activité protonique qu'entraîne l'addition de solvants organiques et qui se répercutent sur la solvatation et sur les interactions des biopolymères avec le milieu environnant. Comme il est difficile, sinon impossible, de corriger ces modifications, l'expérimentation dans les solutions hydro-organiques est demeurée une procédure d'exception, réservée à l'étude de quelques cas particuliers.

D'un autre côté, l'introduction de solvants organiques miscibles aux solutions aqueuses tamponnées abaisse leur point de congélation et permet d'obtenir des solutions de biopolymères encore fluides bien au-dessous de 0°C ce qui pourrait permettre d'intéressantes investigations dans la mesure où les effets du solvant organique seraient corrigés.

A cet égard, l'abaissement de la température doit en principe provoquer l'accroissement de la constante dielectrique du solvant compensant la diminution initiale obtenue à température ordinaire.

Par ailleurs, le choix judicieux de tampons devrait permettre d'éviter une trop large variation de l'activité protonique ou tout au moins de la compenser par un réajustement de la valeur initiale.

Dans ces conditions on peut espérer éviter les altérations observées à température ambiante et bénéficier de l'effet prévisible des basses températures : diminution de l'agitation moléculaire, augmentation de la viscosité, ralentissement des réactions, des transitions de structure ou de phase de certains biopolymères.

Les premières expériences sur des solutions hydro-organiques refroidies bien au-dessous de 0°C ont été réalisées en ordre principal dans ce laboratoire (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7) sur des systèmes et des réactions enzymatiques.

Elles ont été précédées d'études physico-chimiques de l'évolution des paramètres des solvants utilisés en fonction de la température, résultats évoqués dans le premier chapitre et c'est après avoir participé à ces études (8) que nous avons été chargé d'explorer le comportement de macromolécules hélicoïdales placées dans de telles conditions (9)(10)(11)(12)(13), ce travail constitue l'essentiel du présent exposé.

Le domaine de température utilisé nous a obligé à mettre au point une technologie appropriée, l'adaptation de la spectrophotométrie (14) puis de la spectropolarimétrie à des températures pouvant atteindre - 100°C.

Cette exigence a entraîné la construction d'un dispositif spécial décrit dans le premier chapitre.

Notre choix s'est porté sur trois espèces : les polypeptides, les polynucleotides et les acides nucleiques. Ces molécules ont fait l'objet d'études en fonction de différents paramètres pour montrer à l'aide de quelques exemples la contribution que peuvent apporter les basses températures à l'étude des changements de structure et (ou) de phase de ces macromolécules hélicoïdales.

On a déjà dit que des pourcentages élevés de solvants organiques (en particulier de methanol) ont rarement été utilisés en présence des biopolymères précités. Tout était donc à faire dans ce domaine où une addition pure et simple de la phase organique dans les conditions usuelles amène la plupart du temps une précipitation ou une dénaturation du biopolymère.

Nous avons donc dans chaque cas déterminé le pourcentage de solvant, la température, la force ionique, l'activité protonique qui conservent l'intégrité du soluté.

D'autre part dans la mesure du possible nous nous sommes efforcés d'assurer la liaison entre les phénomènes que nous observions dans notre gamme de température et ceux décrits dans les conditions classiques. Nous montrerons, en particulier dans le cas des polypeptides, comment on peut maîtriser l'activité protonique, facteur particulièrement sensible à l'addition de solvants organiques et pourtant souvent négligé même au cours

des études réalisées dans la gamme des températures usuelles.

Moyennant un tel travail, nous verrons qu'on peut expérimenter avec succès des macromolécules hélicoïdales d'intérêt biologique dans des systèmes solvants "antigels" à basse température, et qu'on peut mettre en évidence des faits nouveaux tels que des phénomènes d'agrégation et des états métastables non décelables dans la gamme habituelle des températures.

Au-delà des cas d'espèces envisagés et des phénomènes décrits nous avons voulu vérifier que l'expérimentation des biopolymères en question dans une nouvelle gamme de température était à la fois possible et souhaitable pour parfaire la connaissance de leurs propriétés physico-chimiques.

-°-₀-°-₀-°-₀-°-

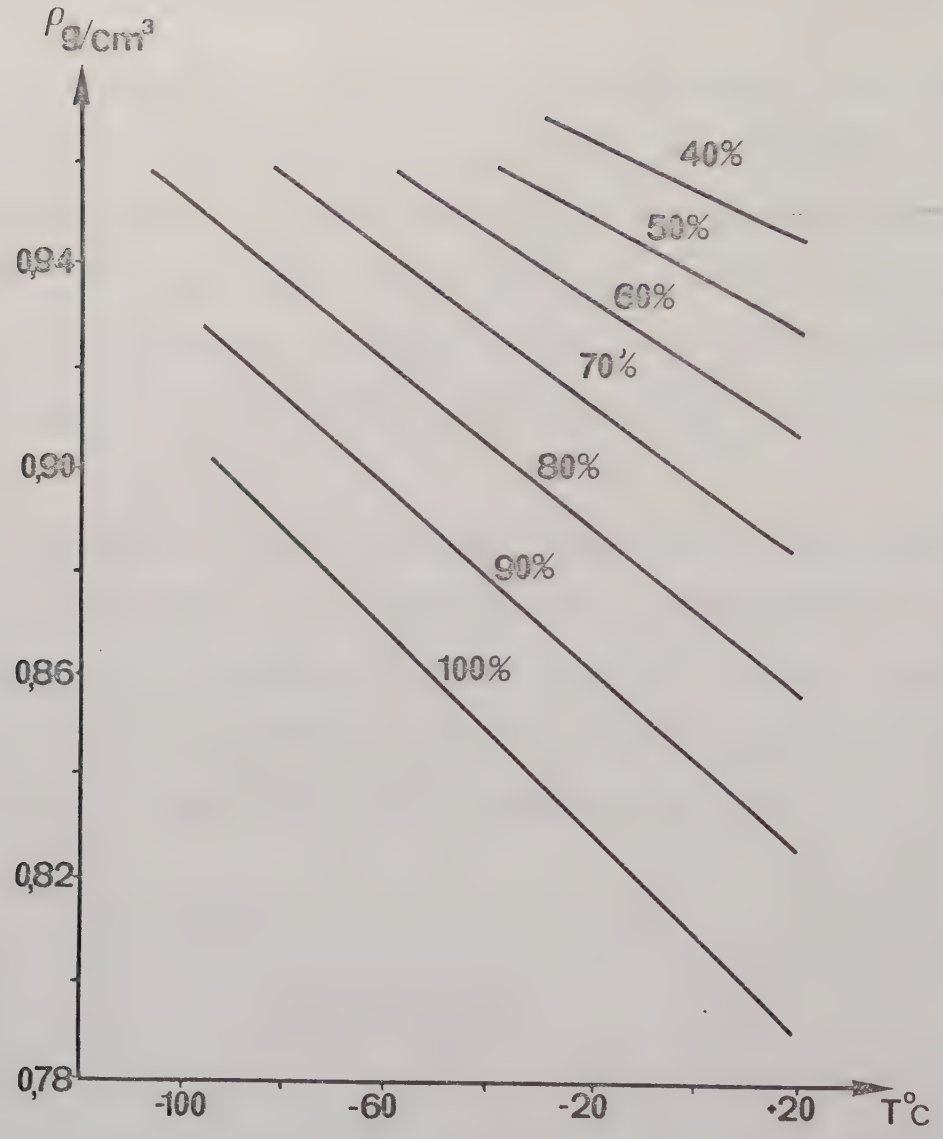


FIGURE 1 : Variation, en fonction de la température, de la masse volumique de différents mélanges methanol-eau. Les chiffres indiquent les pourcentages en volume de methanol.

CHAPITRE I

- EXPERIMENTATION -

I - LES SOLVANTS MIXTES AUX BASSES TEMPERATURES -

Dans l'étude qui suit nous avons essentiellement utilisé comme solvant des mélanges méthanol-eau contenant 70 % ou 50 % en volume de méthanol. Le premier congèle en dessous de - 100°C et le second à - 65°C. Ces valeurs sont d'ailleurs susceptibles de varier suivant le soluté et sa concentration. Nous avons déterminé un certain nombre de paramètres physico-chimique de ces solvants nécessaires à une plus grande compréhension des phénomènes observés à basse température.

1) Masse volumique :

En utilisant la méthode classique basée sur la poussée d'Archimède nous avons mesuré l'évolution de la masse volumique ρ de nos solvants en fonction de la température (15) représentée sur la figure 1.

Nous constatons par exemple que pour 70 % de méthanol ρ passe de 0,88 a 0,96 entre + 20°C et - 80°C ce qui représente une contraction de 8 % qui justifie les corrections de concentrations envisagées ultérieurement.

2) Viscosité :

A l'aide d'un dispositif évoqué au paragraphe III nous avons mesuré la viscosité de nos mélanges à basse température, les résultats sont représentés sur la figure 2. On constate que l'on peut utiliser ces solvants dans une large gamme de température telle que la viscosité ne deviennent pas trop élevée et ne gêne pas la diffusion des solutés, par exemple pour 70 % de méthanol jusqu'à - 70°C la viscosité reste inférieure à 100 centipoises. On peut jouer sur le pourcentage en alcool pour faire varier la viscosité à une température donnée, par exemple à - 50°C elle passe de 18 à 80 centipoises lorsque le pourcentage en méthanol varie de 70 % à 50 %. L'interprétation thermodynamique de ces variations de viscosité a été faite par M.P. LEBEY (15).

3) Constante dielectrique :

Elle constitue un paramètre important dans les interactions intermoléculaires. A l'aide d'un dispositif mis au point au laboratoire et basé sur la mesure de la capacité d'une cellule coaxiale à haute fréquence (8) nous avons mesuré sa variation en fonction de la température et ces résultats sont représentés sur la fig. 3.

On constate que la constante dielectrique ε augmente très notablement lorsque la température baisse en suivant la fonction $\text{Log}\,\varepsilon = a - bT$, expression établie par AKERLOFF (16) à température ordinaire.

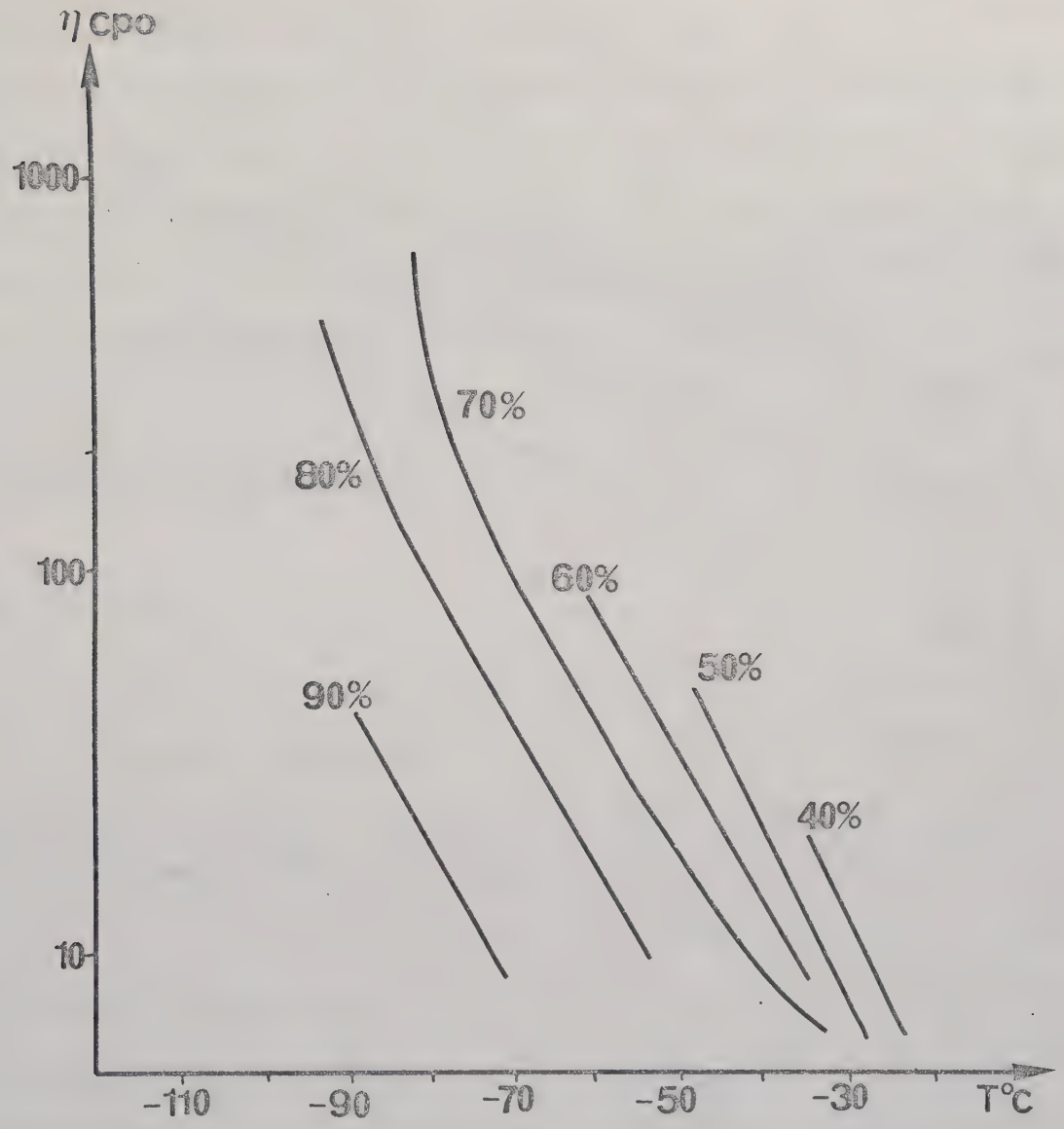


FIGURE 2 : Variations, en fonction de la température, de la viscosité de différents mélanges methanol-eau. Les chiffres indiquent les pourcentages en volume de methanol.

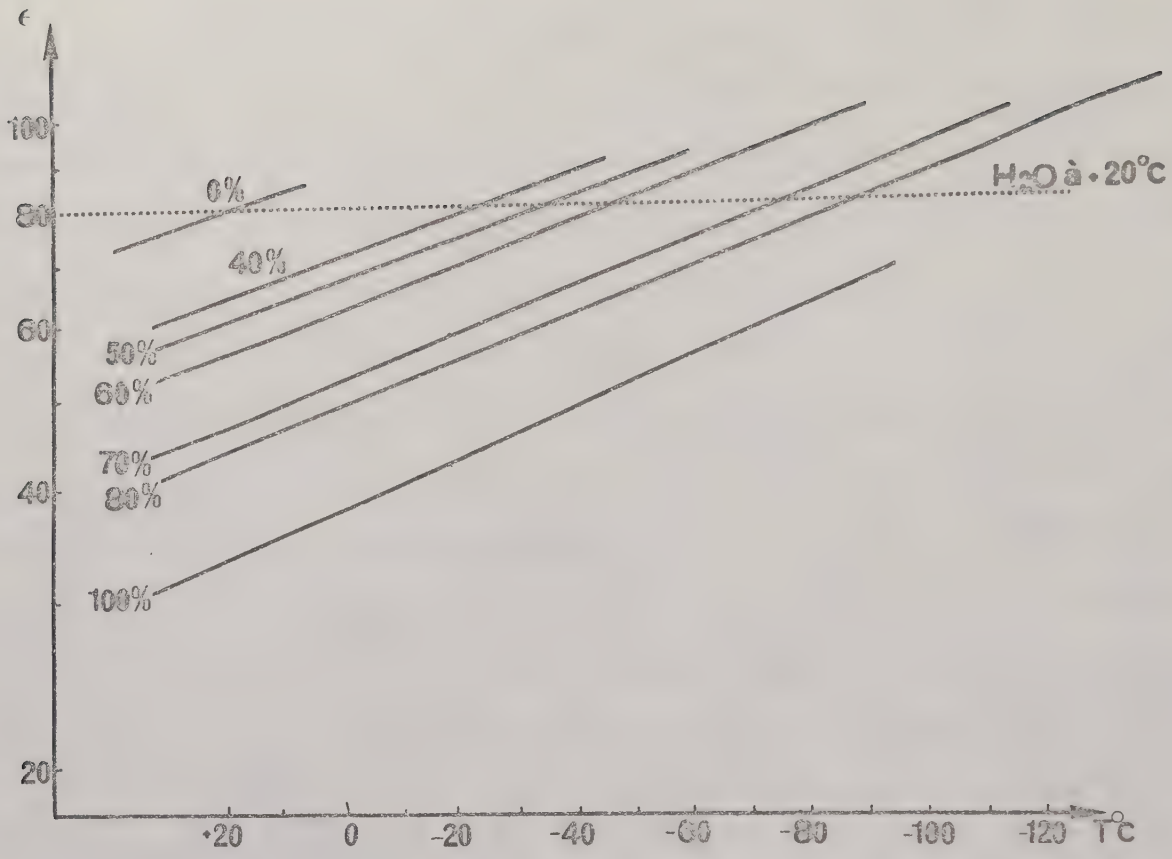


FIGURE 3 : Variations, en fonction de la température, de la constante dielectrique de différents mélanges methanol-eau. Les chiffres indiquent les pourcentages en volume de methanol. L'échelle est logarithmique pour la constante dielectrique montrant la vérification de la loi $\log \varepsilon = a - b\,T$.

La constante dielectrique diminue sensiblement a température ordinaire lors de l'addition de méthanol. Par contre on constate que lorsque la température diminue, et bien avant le point de congélation, $\mathcal{E}$ reprend une valeur proche de celle de l'eau à température ordinaire ($\simeq$ 80). Ce résultat constitue un argument en faveur de la stabilisation structurale de biopolymères à basse température (17).

4) L'activité protonique :

4.a) définition.

Lorsqu'on travaille en présence de solvant organique la notion de pH est remplacée par celle d'activité protonique paH = $-\log \delta [H^+]$ ou $[H^+]$ représente la concentration en protons et δ leur coefficient d'activité dans le solvant considéré qui est égal à 1 en présence d'eau seule. Ce terme peut être calculé par des formules théoriques (8) c'est ainsi que pour une solution HCl 10^{-2}N dans 70 % de méthanol en volume on trouve paH = 2,09 contre 2 dans l'eau.

Lorsqu'on met en solution un acide ou une base on obtient un équilibre du type :

$$AH \longleftrightarrow A^- + H^+$$

Cet équilibre est caractérisé par une constante d'équilibre K dont le cologarithme est appelé pK.

C'est évidemment ce terme qui pour une concentration donnée d'électrolyte détermine la valeur du paH et l'expérience montre qu'il varie notablement selon l'électrolyte, mais aussi en fonction du pourcentage de solvant organique et de la température. Les solutions tamponnées qui assurent la stabilité des biopolymères devront être convenablement "ajustées" ce qui oblige à mesurer les pK d'électrolytes usuels dans les solvants hydro-organiques et à suivre le paH en fonction de la température. Ce travail a été effectué au laboratoire en ordre principal par G. HUI BON HOA (19).

4.b) détermination spectrophotométrique .

On peut partir du principe, vérifié par l'expérience suivant lequel un acide fort en solution hydro-organique (HCl par exemple) est dissocié entièrement à toute température pourvu que la phase organique constitue moins de 70 % en poids du mélange (20). Donc pour une solution HCl 10^{-2}N dans 70 % en volume de méthanol nous prendrons comme référence paH = 2,09 à toute température.

Il existe des molécules ionisables dont les deux formes ont des spectres d'absorption différentiables, et qui sont des indicateurs colorés par l'équilibre :

forme neutre (HIn) $\rightleftharpoons$ forme ionisée (In) + H^+ qui évolue en fonction du paH suivant la relation :

$$paH = pK + \log\frac{\alpha}{1-\alpha} + \log\frac{\gamma\,In}{\gamma\,HIn} \quad (1)$$

Le terme $\log \alpha_{In^-} / \alpha_{HIn}$ peut être calculé et s'avère négligeable, α représente la fraction ionisée et $1-\alpha$ celle qui est neutre ces termes se mesurent par spectrophotométrie suivant une méthode très classique.

On choisit un indicateur coloré dont le pK est voisin de 2 en l'occurence l'ion 3 nitro-aniline mis en solution dans 70 % de méthanol contenant HCl 10^{-2}N De + 20°C à - 100°C on détermine α par spectrophotométrie. Ayant postulé que paH = C^{te} = 2,09, la relation 1 fournit pK = f (T) l'indicateur est alors étalonné.

Cet indicateur est mis dans une solution tamponnée de paH supérieur à 2 (tampon oxalate 10^{-2}M) déterminant α toujours par spectrophotométrie la relation 1 détermine la relation paH = f (T) pour ce tampon. On choisit alors un indicateur de pK supérieur au premier que l'on étalonne à partir du tampon précédent.

De proche en proche on obtient toute une série d'indicateurs colorés dont les pk se distribuent le long de l'échelle des paH (figure 4). Par ailleurs on détermine ainsi la variation de paH en fonction de la température de plusieurs tampons usuels (figure 5). Ces résultats représentés ici pour 70 % de méthanol ont été également obtenus pour d'autres solvants (19).

Il est évident que l'indicateur, qui ne doit pas perturber le paH que l'on veut mesurer doit être employé à faible concentration (généralement autour de 10^{-5}M). Ces indicateurs vont nous permettre de suivre l'évolution du paH en f (T).

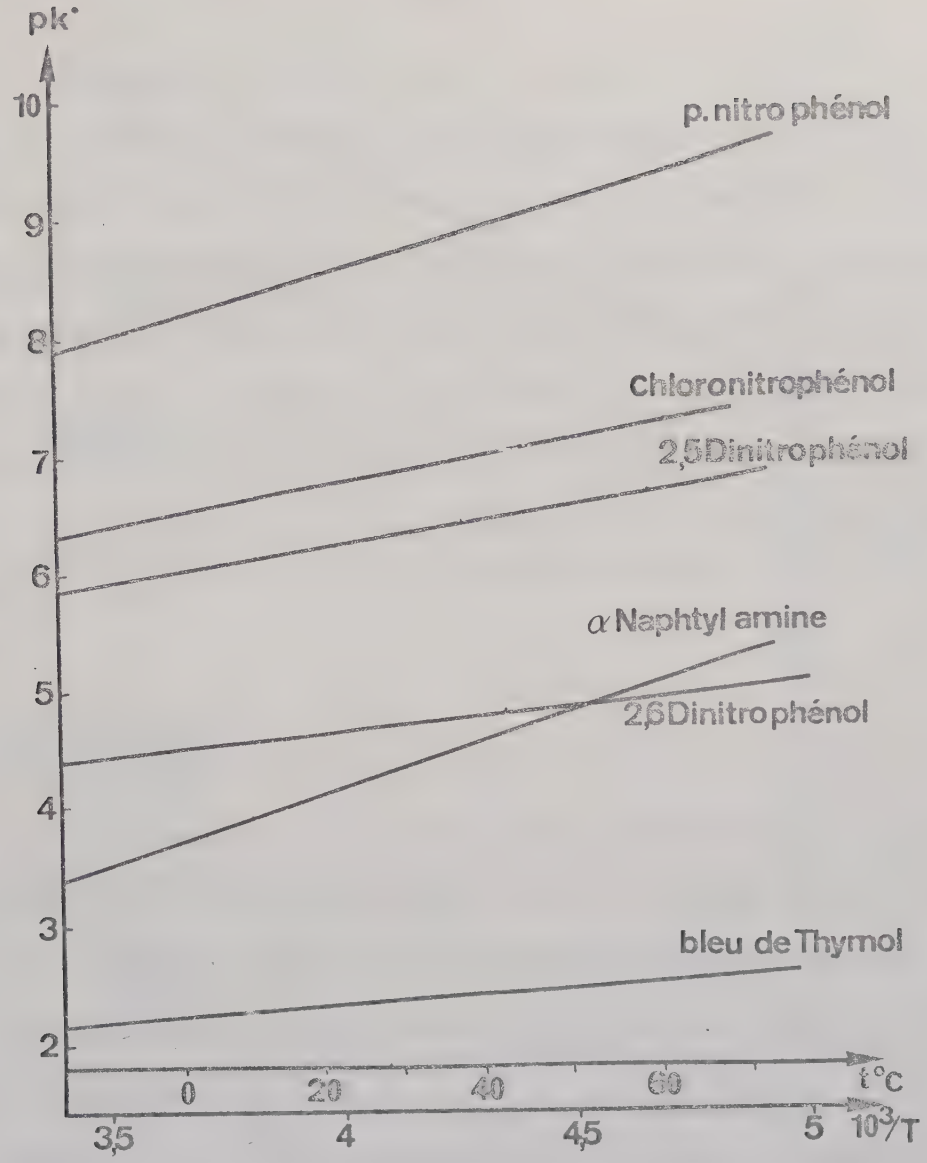


FIGURE 4 : Variations, en fonction de l'inverse de la température T, du pK de différents indicateurs dans le mélange methanol (70 %)-eau (30 %).

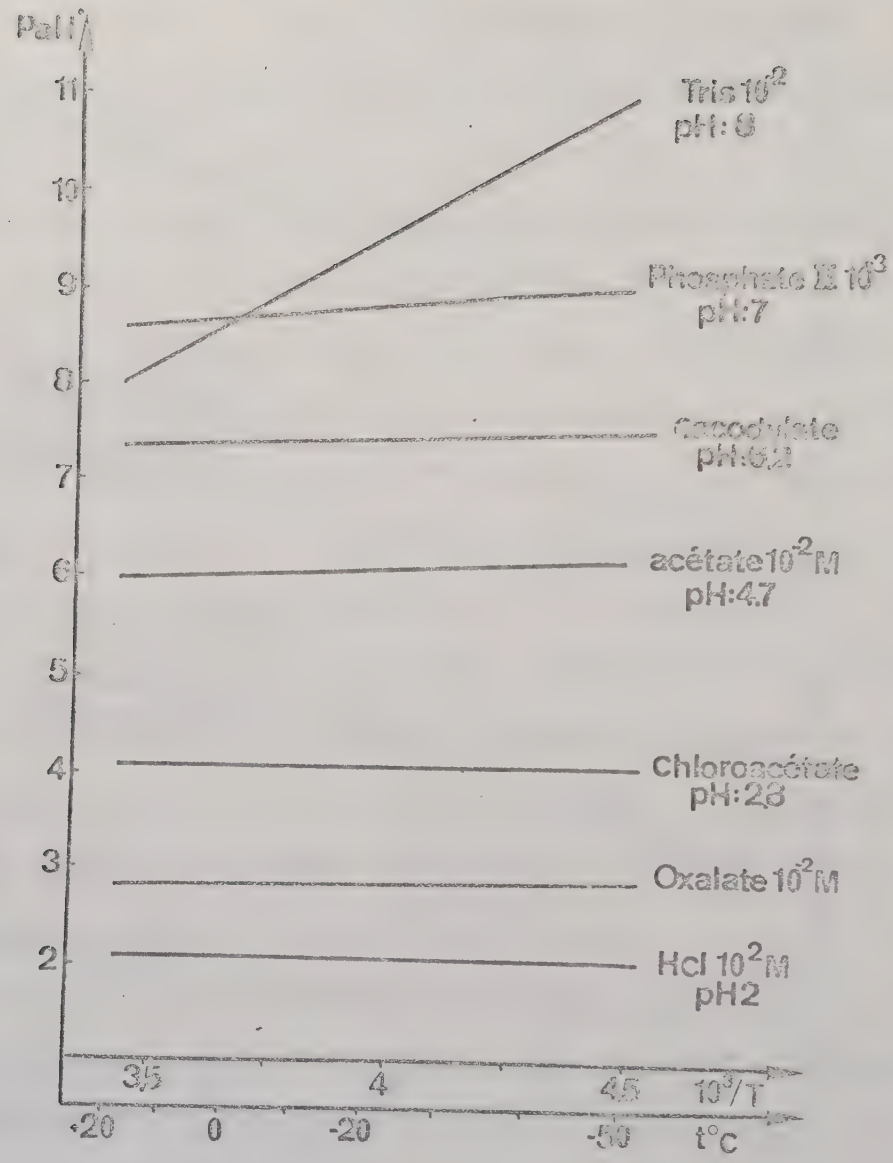


FIGURE 5 : Variation, en fonction de l'inverse de la température T, de l'activité protonique (paH) de différentes solutions tampons dans le mélange méthanol (70 %)-eau (30 %).

4.c) utilisation d'un pH mètre .

L'indication fournie par le pH mètre lorsqu'on est en présence de solvant organique est évidemment éronnée mais peut cependant être sollicitée à température ordinaire. A partir des tampons déjà étalonnés par la méthode précédente, le pH mètre étant utilisé en millivoltimètre, on détermine la courbe paH = f (mV). Cette courbe permet de déterminer le paH d'une solution inconnue dans le même solvant. Cet étalonnage est pratiqué avant chaque mesure car la dérive en présence de solvant organique est importante.

5) La force ionique :

Cette grandeur que l'on peut caractériser simplement par la concentration en cations (et donc en anions) présents dans la solution est souvent déterminante pour la stabilité des biopolymères, la gamme de concentration utilisée habituellement se situe entre 10^{-2} et 10^{-1}M.

En solution hydro-organique et à basse température la force ionique doit être souvent diminuée à cause de l'abaissement de solubilité des sels qui précipitent (très critique avec le tampon phosphate pour des concentrations supérieures à 10^{-3}M) ou encore par suite de la précipitation de certains solutés à basse température.

Il n'existe pas de règle générale sur ce point : chaque biopolymère étudié doit faire l'objet d'essais empiriques pour

trouver aussi bien le paH que la force ionique permettant l'expérimentation à basse température.

II - LES MESURES SPECTROSCOPIQUES AUX BASSES TEMPERATURES -

1) Spectrophotométrie d'absorption :

Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectrophotomètre CARY 15 spécialement équipé à basse température (14) suivant un principe proche de celui présenté plus loin pour la spectropolarimétrie.

Les larges variations de température utilisées entraînent deux effets dont il faut tenir compte sous peine d'interprétations erronées.

1.- Les spectres en l'absence de toute transition ou interaction présentent un effet hyperchrome du à un affinement des raies résultant de la diminution du mouvement brownien, du fait de la diminution de température.

2.- La contraction des solvants refroidis détermine une hyperchromie supplémentaire : si c_o est la concentration à température normale où la masse volumique du solvant est ρ_o, si c et ρ sont les mêmes paramètres à la température T on a la ralation $c = c_o \rho / \rho_o$ ce qui permet de corriger les spectres. La masse volumique des solvants utilisés est figurée dans ce chapitre (figure 1).

2) Spectropolarimétrie :

2.a) Généralités .

Toutes les substances sont susceptibles d'interactions avec un rayonnement électromagnétique dans des domaines variés de longueur d'onde. Cette interaction correspond dans la molécule concernée à une transition électronique, rotationnelle ou vibrationnelle, suivant le domaine de longueur d'onde et la plus courante des techniques étudie l'absorption d'énergie qui en résulte.

Si la radiation électromagnétique de longueur d'onde λ est polarisée rectilignement, c'est-à-dire si son vecteur électrique $\vec{E}$ garde une direction fixe, à la traversée de certaines substances cette direction peut tourner d'un angle α dépendant de λ . Ce phénomène s'appelle la dispersion rotatoire optique (DRO) et la substance correspondante est dite optiquement active. L'étude de la courbe $\alpha = f(\lambda)$ constitue l'objet de la spectropolarimétrie.

La courbe de dispersion rotatoire a en général une allure caractéristique appelée effet Cotton présentant un changement brusque du signe de la rotation pour une longueur d'onde λi, ceci correspondant mathématiquement à une discontinuité. Ce phénomène est obligatoirement associé à un chromophore c'est-à-dire à une partie de la molécule objet d'une transition électronique sous l'action de l'onde électromagnétique, et la longueur d'onde λi correspond théoriquement au maximum d'absorption (figure 6).

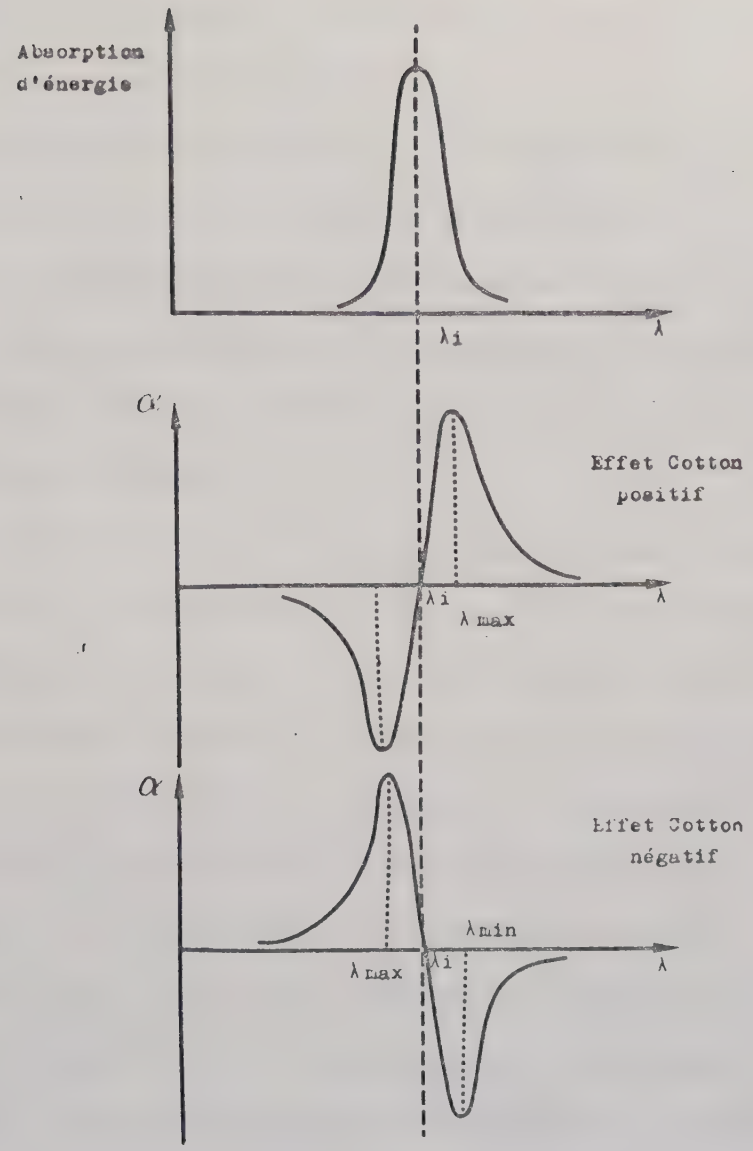


FIGURE 6 : Représentation théorique de l'effet Cotton.

Sur cette même figure sont représentés les deux types possibles d'effet Cotton positif ou négatif.

En fait un chromophore est rarement isolé dans une molécule en particulier dans le domaine ultra violet qui nous intéressera : il en résulte que les différents couplages et chevauchements des bandes entraînent une déformation des spectres ainsi qu'un décalage parfois important entre la longueur d'onde λ i et le maximum d'absorption.

Les substances qui nous intéressent sont des solutions de polypeptides dont le chromophore est la liaison peptidique dont le maximum d'absorption est à moins de 200 nm alors que λ i se trouve aux environs de 220 nm. Nous étudierons également des solutions d'acides nucléiques et de polynucleotides dont les chromophores sont constitués par les bases cycliques dont le maximum d'absorption est à 260 nm pour λ i voisin de 270 nm.

Il est admis (21) que l'activité optique est liée à un environnement assymétrique du chromophore, crée par les atomes voisins agissant sur les orbitales concernant le chromophore. La courbe de dispersion rotatoire est donc affectée par cet environnement, elle se modifie lorsque celui-ci varie c'est-à-dire lorsque la structure de la molécule est l'objet de perturbations ou de transitions.

Il est important de noter que la rotation α est souvent détectable loin de la longueur d'onde λ i ce qui permet de faire des mesures dans des domaines expérimentalement plus accessibles. Ce n'est pas le cas de la spectrophotométrie en particulier dans

le cas des polypeptides qui absorbent dans l'UV lointain alors que la rotation peut s'étudier dans le visible.

Une lumière polarisée rectilignement peut se décomposer en deux vibrations circulaires de sens contraire, qui peuvent être absorbées différemment par une substance optiquement active (21). Ce phénomène constitue le dichroïsme circulaire qui complète ou remplace avantageusement la dispersion rotatoire. Nous ne disposons pas de cette technique au laboratoire et nous pensons qu'il serait utile dans l'avenir de l'utiliser dans nos conditions.

2.b) Exploitation des spectres de D.R.O.

La rotation α créée par une solution d'une substance active suit une loi simple :

$$\alpha = [\alpha]\, C.l$$

α : valeur mesurée en degrés à la longueur d'onde λ.

l : trajet optique en décimètre.

c : concentration de la substance active en g/ml.

$[\alpha]$: rotation spécifique de la substance à la longueur d'onde λ en degrés $g^{-1}ml\ dm^{-1}$.

Le but recherché est de relier les spectres obtenus $\alpha = f(\lambda)$ à la structure de la molécule correspondante. Pour cela on peut chercher une expression analytique de la courbe introduisant des paramètres que l'on pourra relier à telle ou telle structure de la molécule.

Pour les polypeptides plusieurs expressions analytiques des spectres de DRO ont été proposées nous choisirons la plus simple, néanmoins satisfaisante dans notre cas, il s'agit de l'équation de Moffit-Yang (22) qui nécessite d'abord l'introduction des paramètres suivants :

$\left[\Phi\right]_\lambda = \left[\alpha\right] \frac{M}{100}$: rotation molaire ou M représente la masse molaire du monomère constituant le polypeptide.

$\left[m'\right]_\lambda = \left[\Phi\right] \frac{3}{n_\lambda^2 + 2}$: rotation molaire effective où n_λ représente l'indice de réfraction du solvant à la longueur d'onde λ .

Nous n'avons pas eu la possibilité de mesurer la variation de n_λ avec la température, aussi nous la négligerons, approximation qui ne devrait pas mettre en cause notre interprétation des résultats si on extrapole les variations mesurées dans la gamme usuelle de température.

Moffit et Yang ont donc montré que $\left[m'\right]_\lambda$ pouvait se mettre sous la forme :

$$\left[m'\right]_\lambda = a_o \frac{\lambda_o^2}{\lambda^2 - \lambda_o^2} + b_o \frac{\lambda_o^4}{(\lambda^2 - \lambda_o^2)^2}$$

Cette équation introduit trois paramètres a_o, b_o, λ_o caractérisant la molécule étudiée, λ_o correspondrait théoriquement au λi défini dans le paragraphe précédent, en fait expérimentalement il s'en écarte pour les raisons déjà citées. Ces trois paramètres sont déterminés expérimentalement :

$[m']_\lambda$ ayant été calculé à partir de la valeur mesurée de α pour chaque longueur d'onde, on représente graphiquement :

$$[m'] \cdot \frac{\lambda^2 - \lambda_0^2}{\lambda_0^2} = f\left(\frac{\lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2}\right)$$ en cherchant la valeur de λ_0 qui donne une représentation linéaire on obtient ainsi $\lambda_0 = 212$ nm dans le cas de l'acide polyglutamique. La pente de la droite obtenue et son ordonnée à l'origine fournissent respectivement b_0 et a_0 avec une précision relativement médiocre (10 %).

b_0 et a_0 caractérisent la structure du polymère, b_0 étant relié à l'hélicité, c'est-à-dire à la répartition spatiale des chromophores cependant que a_0 est plus sensible à leur environnement et sera sensible particulièrement à l'agrégation.

L'expression de Moffit-Yang constitue un développement limité et telle qu'elle se présente n'est valable que si λ reste grand devant λ_0, l'expérience montre que $\lambda > 300$ nm est une condition satisfaisante. A la limite si $\lambda \gg \lambda_0$ on obtient $\alpha = A/\lambda^2$ expression établie par Biot au siècle dernier.

2.c) Spectropolarimètre.

Nous avons utilisé le SPECTROPOL I FICA qui permet de détecter des rotations de 10^{-3} degrés depuis 200 jusqu'à 600 nm. L'échantillon est placé dans un compartiment de mesure entre polariseur et analyseur croisés : la rotation α qu'il introduit rétablit la propagation de la lumière détectée par un photomultiplicateur. Sur le trajet se trouve une bobine à effet Faraday

qui par un courant I rétablit l'extinction en faisant tourner le vecteur lumineux d'un angle $-\alpha$. Il s'agit là d'une méthode de zéro et la loi de Faraday $\alpha = kI$, fournit un courant enregistré proportionnel à α.

Cet appareil possède une bonne sensibilité (10^{-3} degrés) et une bonne stabilité. Cependant il est caractérisé par une constante de temps élevée et il faut 30 mn pour enregistrer un spectre sur 100 nm sur les grandes sensibilités. D'autre part on ne peut travailler sur des échantillons présentant une densité optique supérieure à 1,5 ce qui est parfois gênant en particulier dans le cas de l'A.D.N. qui présente une forte absorption et une rotation faible dans la gamme de longueur d'onde utilisée. Nous avons équipé cet appareil d'une prise d'enregistrement séparée qui permet d'envoyer le signal correspondant à α sur un enregistreur XY dont l'autre voie est alimentée par la tension d'un thermocouple plongeant dans la cellule, on obtient ainsi directement la courbe $\alpha = f(T)$, T est la température de la solution.

2.d) Equipement aux basses températures :

Pour pratiquer des mesures à basse température, cet appareil a dû être équipé en conséquence. Après diverses versions nous avons retenu le cryostat porte-cellule schématisé sur la fig.7, qui s'inspire du dispositif livré avec l'appareil pour thermostater à haute température.

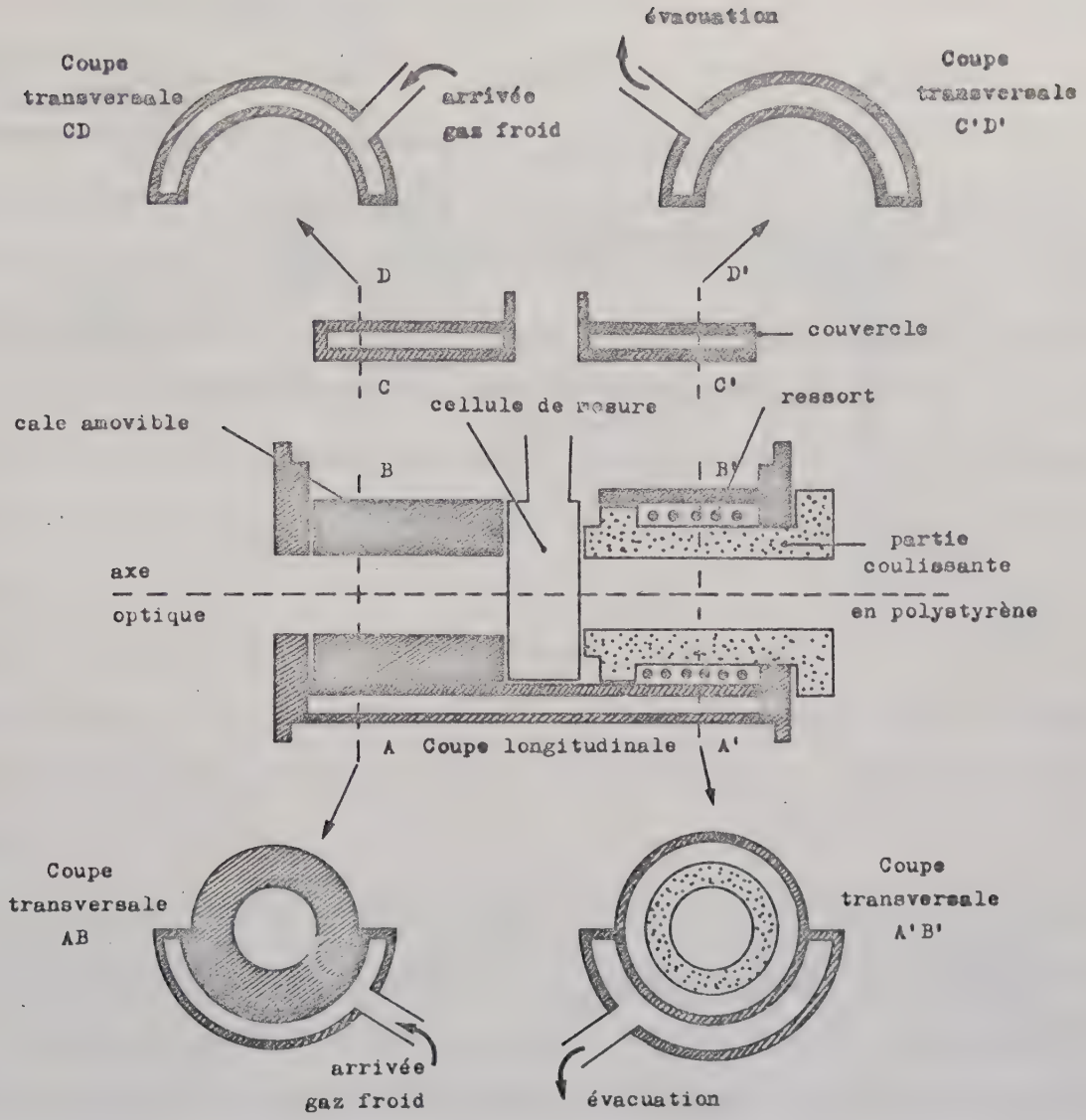


FIGURE 7 : Schéma du porte-cellule utilisé pour les mesures spectropolarimétriques à basse température.

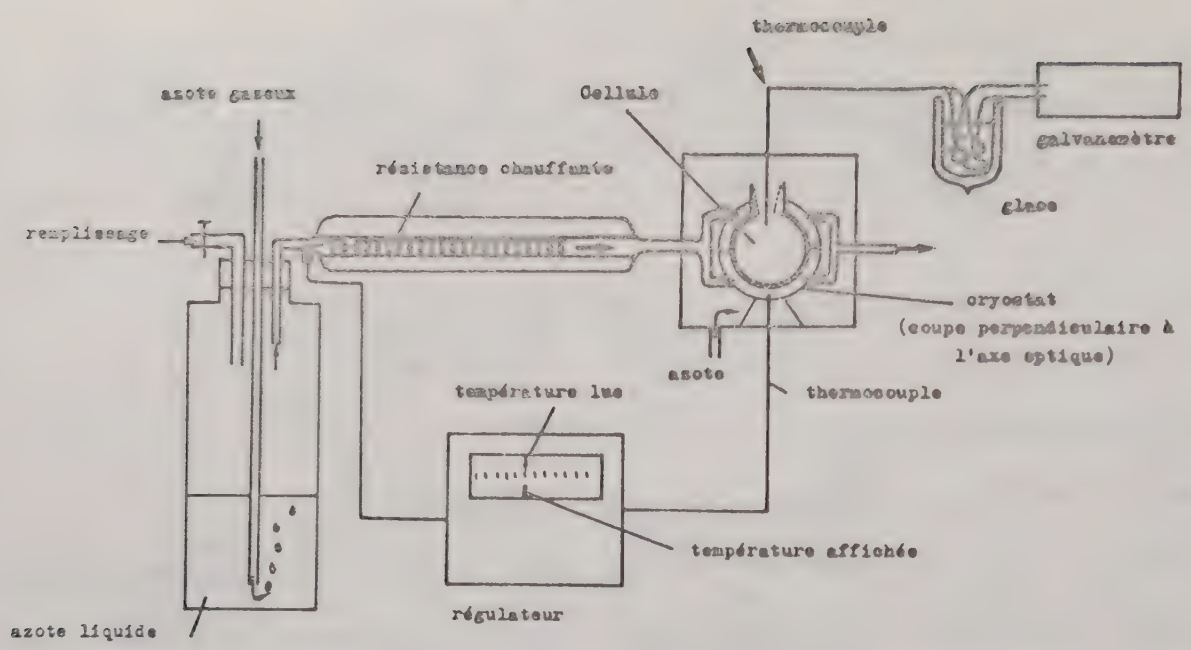


FIGURE 8 : Schéma de principe du dispositif de thermostatisation du gaz assurant le refroidissement du porte-cellule.

Le cryostat est constitué de deux demi cylindres métalliques à double parois entre lesquelles circule le fluide de thermostatisation se partageant entre les deux parties. La partie inférieure repose sur le porte échantillon du compartiment de mesure, la cellule cylindrique y est posée puis recouverte de la partie supérieure. Des cales permettent de positionner la cellule de manière reproductible en même temps qu'elles assurent un bon contact thermique. Nous utilisons le plus souvent des cellules en quartz de 1 cm de trajet optique nécessitant un volume minimum de 2,5 ml.

Comme fluide de thermostatisation nous avons choisi l'azote gazeux à la place d'un liquide dont l'inertie est trop élevée et dont la viscosité à basse température entraîne des difficultés de circulation.

L'ensemble du dispositif de thermostatisation du gaz est représenté sur la figure 8. L'azote provient de bouteilles sous pression (azote R Air Liquide) et son débit est réglé de 0 à 50 l/mn par un débit mètre Dynamal, il barbotte dans un récipient calorifugé LD 10 Union Carbide contenant de l'azote liquide. L'emploi d'air comprimé est déconseillé bien que plus économique car son humidité provoque l'obturation des canalisations, de plus l'oxygène se trouve piégé par l'azote liquide qu'il remplace progressivement constituant un danger certain.

L'azote ainsi refroidi vers - 150°C est dirigé vers le cryostat par un tube en verre à double enceinte sous vide renfermant une résistance chauffante THERMOCOAX de 50 W. Un thermocouple THERMOCOAX chromel-alumel est logé dans une petite cavité percée

dans le cryostat dont la température ainsi mesurée est envoyée à un régulateur de température GIROUX CAPA 1 muni d'une compensation électronique de soudure froide. Sur ce régulateur on affiche la température désirée, et quand celle du cryostat, atteint la même valeur sous l'action du gaz froid, la résistance chauffante débite, et son intervention intermittente assure la régulation.

La température du cryostat est régulée à $\pm$ 1°C mais l'inertie des échanges thermiques avec la cellule assure une précision supérieure à 1/100°C, la température exacte est lue à l'aide d'un second thermocouple relié par une soudure froide à un galvanomètre. On peut faire varier la température de - 100°C à + 100°C avec si besoin est des variations pouvant atteindre 10°C par minute.

Pour éviter tout problème de givrage sur les fenêtres optiques le compartiment de mesure est maintenu sous pression par de l'azote sec à température ordinaire.

En diminuant la température on n'observe pas de déformation de la ligne de base, simplement une petite translation qui atteint dans le cas extrême (- 100°C) 2 millièmes de degrés.

III - VISCOSIMETRIE -

Pour mesurer la viscosité de solutions à basse température, il faut utiliser un appareil pouvant mesurer une très large gamme de viscosité (de quelques dizaines de centipoises à plusieurs milliers) sur un large intervalle de température (+ 20°C à - 140°C). Aucun appareil du commerce ne semblant convenir nous

avons construit spécialement au laboratoire (15) un viscosimètre basé sur la mesure de la vitesse limite de la chute d'une bille au sein de la solution. Il faut signaler que le procédé utilisé en la circonstance n'a pas la précision des viscosimètres habituels.

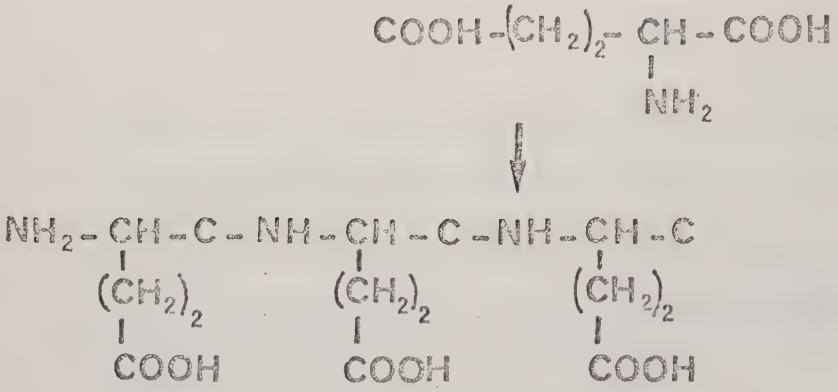
La viscosité d'une solution peut varier parfois notablement autour de la valeur de celle du solvant en fonction du soluté concerné et de ses changements éventuels de structure.

Si η désigne la viscosité du solvant seul à la température T et η' celle de la solution à la même température, la contribution du soluté se mesure par la quantité $\eta_r = (\eta' - \eta) / \eta$ appelée viscosité spécifique. Si la concentration C tend vers zéro la quantité η_s / C tend vers une limite $[\eta]$ appelée viscosité intrinsèque.

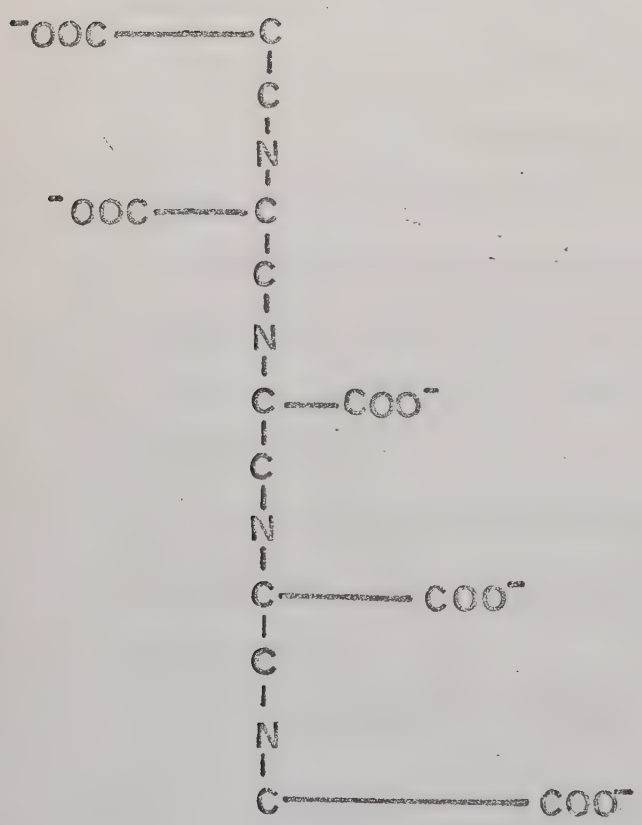
Du point de vue hydrodynamique une macromolécule peut être assimilée à un ellipsoïde de révolution de grand axe a et de petit axe b.

Flory et Fox (23) ont calculé que :

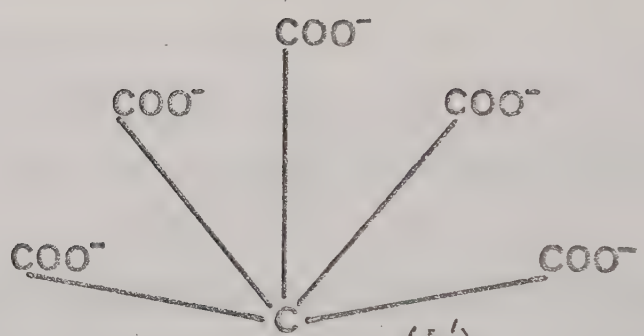
$$[\eta] = K\left(\frac{a}{b}\right)^{\alpha} \frac{4}{3} ab^2 \frac{1}{M}$$ où M représente la masse molaire du polymère, α est un coefficient dépendant des interactions du polymère et du solvant et qui reste proche de 1,8. Cette expression permet de suivre éventuellement l'évolution de paramètres tels que a et b.



(a)



(b)



(b')

FIGURE 9 : Polymérisation de l'acide glutamique (a). Structure de la forme "étirée" de l'acide poly glutamique:(b) projection parallèle à la chaîne peptidique,(b') projection perpendiculaire à la chaîne peptidique.

CHAPITRE 2

- LES POLYPEPTIDES -

L'intérêt que présentent les chaînes polypeptidiques "synthétiques" linéaires et plus précisemment hélicoïdales est connu de tous, que ce soit pour l'étude physico-chimique des chaînes naturelles hélicoïdales ou pour celle des chaînes qui se replient et constituent des ensembles "globulaires". Ces chaînes polypeptides ont fait l'objet de nombreux travaux mais, à notre connaissance, c'est la première fois qu'on tente d'étudier leur comportement dans les conditions que nous avons choisies.

Nous avons étudié l'acide poly-L-Glutamique (poly Glu) provenant de la polymérisation de l'acide L-Glutamique (acide amino glutamique). A titre de comparaison nous avons brièvement testé un polypeptide basique : la poly Lysine (poly Lys) qui correspond à la L-Lysine.

La polymérisation s'opère par condensation entre un groupement carboxylique d'une molécule et le groupement α aminé d'une autre donnant naissance à la liaison peptidique (fig.9). Cette liaison constitue un chromophore important peu accessible en absorption (maximum situé vers 200 nm) mais donnant un effet Cotton négatif dont le premier minimum est situé à 233 nm, cette réponse spectroscopique est le reflet de la répartition spatiale des chromophores c'est-à-dire de la structure de la macromolécule.

Les polypeptides prennent des conformations diverses suivant les conditions de milieu : hélice α , structure β plissée avec structure tertiaire plane et antiparallèle jouant un rôle important dans les protéines. Plus récemment une structure "étirée" a été suggérée (fig.9) dont nous aurons l'occasion de reparler.

I - LES SOLUTIONS -

Le poly Glu utilisé est un sel de sodium provenant de chez Sigma (Grade III). Nous l'employons tel que, à des concentrations variant de quelques mg/ml à quelques 10^{-1} mg/ml soit d'environ 10^{-2} à 10^{-3}M en monomère ce qui correspond également à la teneur en Na^+.

Le polymère est dissout d'abord dans l'eau puis on ajoute à 0°C le solvant organique en quantité choisie, le paH est alors ajusté avec soude ou acide chlorhydrique au pH mètre préalablement étalonné comme indiqué au chapitre I.

Nous avons utilisé plusieurs échantillons de masse molaire allant de 10^4 à 10^5 g ceci n'influe pas sur l'essentiel des résultats présentés ici, on note simplement une certaine dispersion des valeurs numériques (température de transition par exemple) même pour des échantillons de même masse molaire mais provenant de lots différents.

Pour obtenir des résultats reproductibles en solution hydroalcoolique il est nécessaire d'attendre un certain temps au

voisinage de 0°C (environ 1 heure) pour que le paH de la solution se stabilise. Lorsque la solution a passé plusieurs heures à température ordinaire, on note un comportement anormal pouvant aller jusqu'à la précipitation, aussi la solution est toujours utilisée fraîche.

Le poly Lysine (HBr) et la poly Arginine (HCl) proviennent de chez Miles et les mêmes observations que pour le poly Glu leur sont applicables.

II - LE POLY GLU A TEMPERATURE ORDINAIRE EN PRESENCE DE METHANOL -

1) Résultats :

De très nombreuses études ont été consacrées sur ce point en suivant l'évolution de paramètres spectroscopiques (dispersion rotatoire, dichroisme circulaire, absorption) ou hydrodynamiques (viscosité, vitesse de sédimentation).

La première étape consiste à suivre à température ordinaire l'évolution de la structure du poly Glu en fonction de l'activité protonique du milieu aussi bien en phase aqueuse (24) que dans un certain nombre de solvants organiques (24)(25). Dans toutes ces études les valeurs de pH ne sont jamais corrigées de la présence du solvant organique, aussi nous avons repris l'étude comparée de la structure du poly Glu dans l'eau et dans 70 % de méthanol en fonction de l'activité protonique paH du milieu, notion définie au chapitre I.

Sur la figure 10 est représentée la variation du paramètre de structure b_o en fonction du paH dans l'eau et dans 70 % de méthanol, on constate dans les deux cas que en augmentant le paH, le poly Glu passe d'une structure d'hélicité importante (b_o élevé) à une hélicité très faible ($b_o \simeq 0$) avec un paH de demi-transition notablement plus élevée par la présence du méthanol.

2) Discussion :

Lorsque le paH est faible le poly Glu est sous forme hélice et la présence du méthanol donne à b_o une valeur plus élevée, il a d'ailleurs été montré que cette augmentation n'est pas purement spectroscopique mais semble bien effectivement correspondre à une structure d'hélicité supérieure.

Dans l'eau à pH = 4,6 un abaissement de la température induit un changement important de la rotation se traduisant par une constance de b_o et une variation de a_o: cette transition qui apparaît vers + 4°C a été interprétée comme une agrégation (26) accompagnée d'un phénomène d'hystérèsis. Nous verrons qu'à basse température avec le méthanol on peut obtenir un phénomène semblable.

Lorsque le paH est au-dessus de la valeur correspondant à la transition il était traditionnellement attribué au polymère une structure dite en pelote statistique il semble bien que celle-ci n'existe pas tout au moins dans ces conditions. Des études par dichroisme circulaire (27)(28) ont conduit à attribuer dans ce cas une structure étirée, c'est-a-dire une chaîne plus ou moins

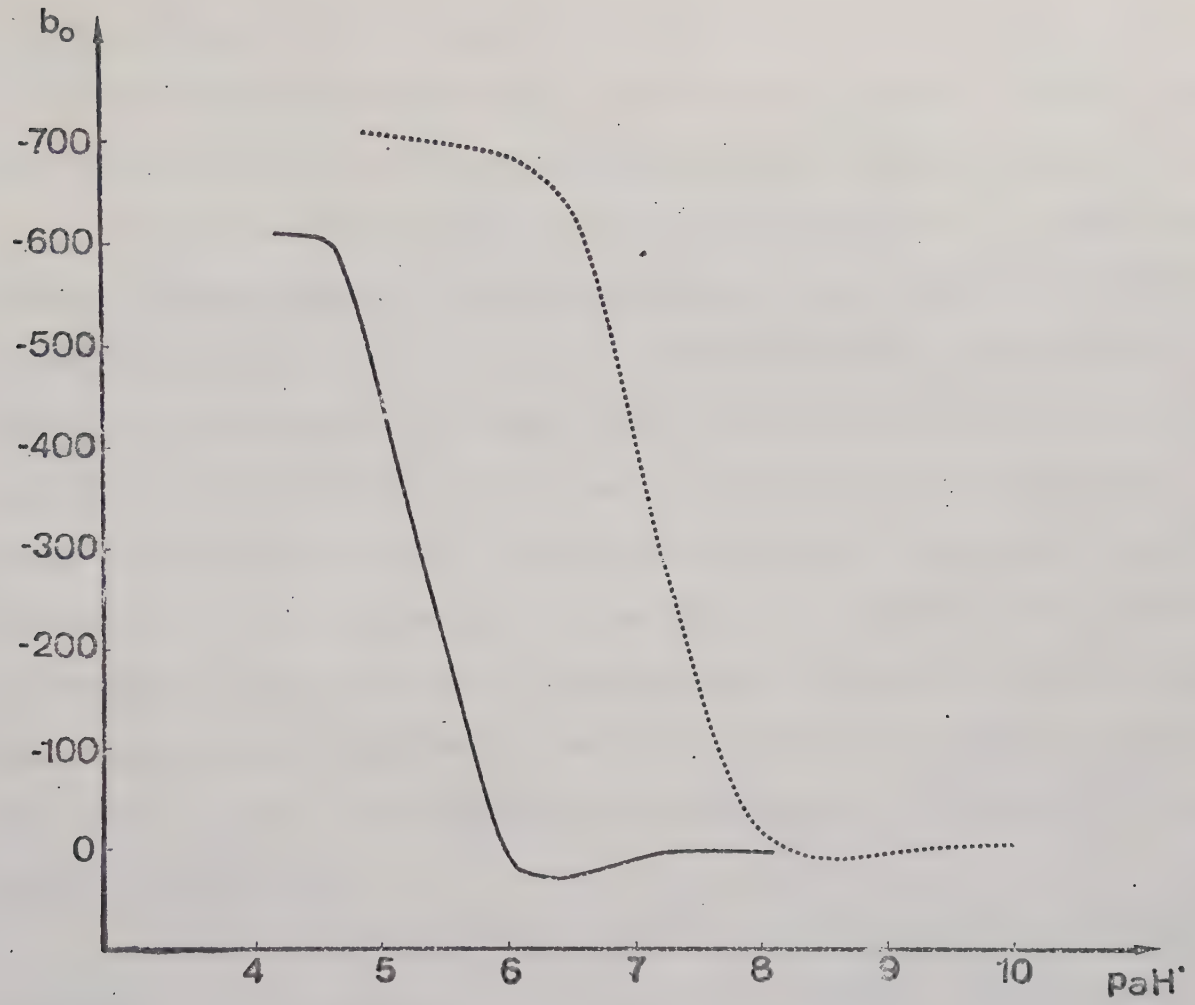


FIGURE 10 : Evolution du paramètre d'hélicité b_o de l'acide poly glutamique, en fonction de l'activité protonique paH, dans l'eau (____) puis dans 70 % de methanol (....).

rigide, formée par les liaisons peptidiques, constituant l'axe d'une hélice sur laquelle sont répartis les groupes acides ionisés, cette structure correspondant à un maximum d'énergie (Fig.9).

Il est frappant de constater en examinant la figure que l'effet globalement le plus important, résultant de l'addition de 70 % de méthanol, consiste en une translation de la courbe de transition en fonction du paH. Nous pensons que ceci est le résultat de la variation du pK de l'acide sous l'action du méthanol comme il est généralement observé (29) pour de nombreux acides. Lorsqu'on n'a pas cette vue d'ensemble du phénomène une addition de méthanol peut conduire à interpréter les variations observées comme une action profonde du solvant sur les paramètres structuraux alors qu'une correction de paH ramène le phénomène à de plus justes proportions.

Ainsi à température ordinaire, en dehors d'une variation notable de pH, le méthanol n'a pas une influence considérable sur la structure secondaire des polypeptides. Ceci nous permettra d'admettre que dans 70 % de méthanol pour paH $\leqslant$ 6 le poly Glu est sous forme hélice alors que pour paH $\geqslant$ 8 il est sous forme étirée. On travaillera entre ces valeurs de paH pour éviter certains phénomènes de précipitation et de dénaturation qui peuvent se manifester en dehors de ces limites.

III - LE POLY GLU A PAH $\leqslant$ 6 ET A BASSE TEMPERATURE -

1) Résultats .

Pour paH = 5 dans 70 % de méthanol le poly Glu présente une hélicité importante comme en témoigne la valeur élevée de b_o (Fig. 10). Lorsqu'on diminue la température, vers - 20°C le pouvoir rotatoire change assez brusquement (Fig. 11) et se stabilise en deçà de - 30°C. Si on augmente la température, le retour à l'état initial ne se produit que pour une température nettement supérieure, constituant ainsi un cycle d'hystérèsis dont la "largeur" est d'environ 15°C. Ce cycle est reproductible et ne dépend pas de la vitesse de chauffage ou de refroidissement. Si on stabilise la température pendant la transition, on peut enregistrer la courbe de dispersion rotatoire permettant de déterminer a_o et b_o (Fig. 11). Le paramètre b_o reste sensiblement constant jusqu'à - 30°C alors que a_o passe de 0 à + 300°.

2) Discussion .

La transition que nous observons est très semblable à celle observée en solution aqueuse à pH = 4.6 entre + 20°C et + 4°C (26). Dans ces conditions il a été mis en évidence une agrégation du poly Glu en abaissant la température. Lors de ce phénomène, on observe une valeur constante de b_o et une variation importante de a_o. On a attribué à a_o le rôle de "marqueur" de l'environnement des chromophores peptidiques qui sera sensible à des phénomènes tels que l'agrégation.

D'apres cette interprétation, nous concluons qu'à - 20°C dans 70 % de méthanol et à paH = 5 le poly Glu initialement sous forme hélice s'agrège au fur et à mesure que la température dimi-

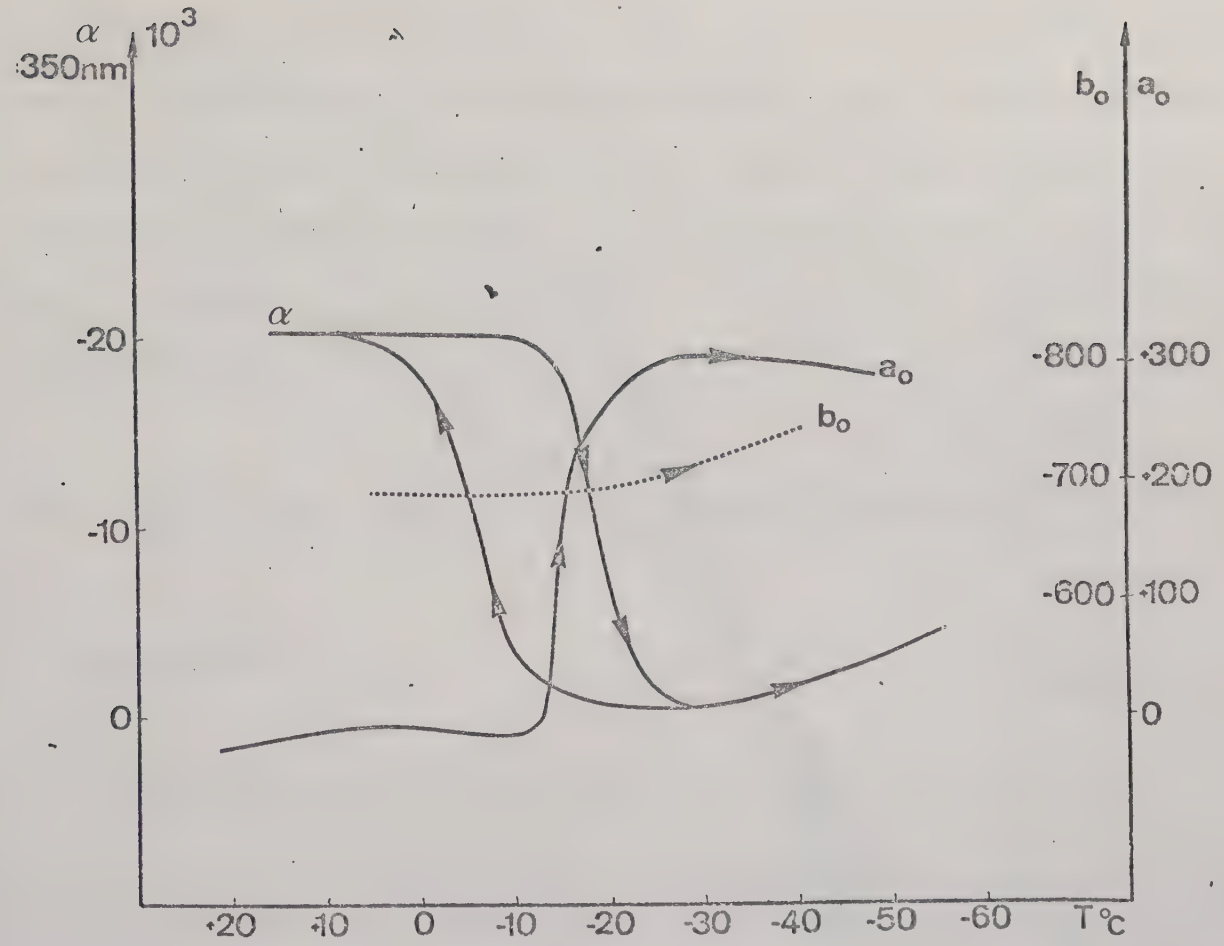


FIGURE 11 : Evolution, en fonction de la température, de la rotation (α) et des paramètres a_o et b_o pour une solution d'acide poly glutamique (c = 1 mg/ml) dans 70 % de methanol paH = 5.

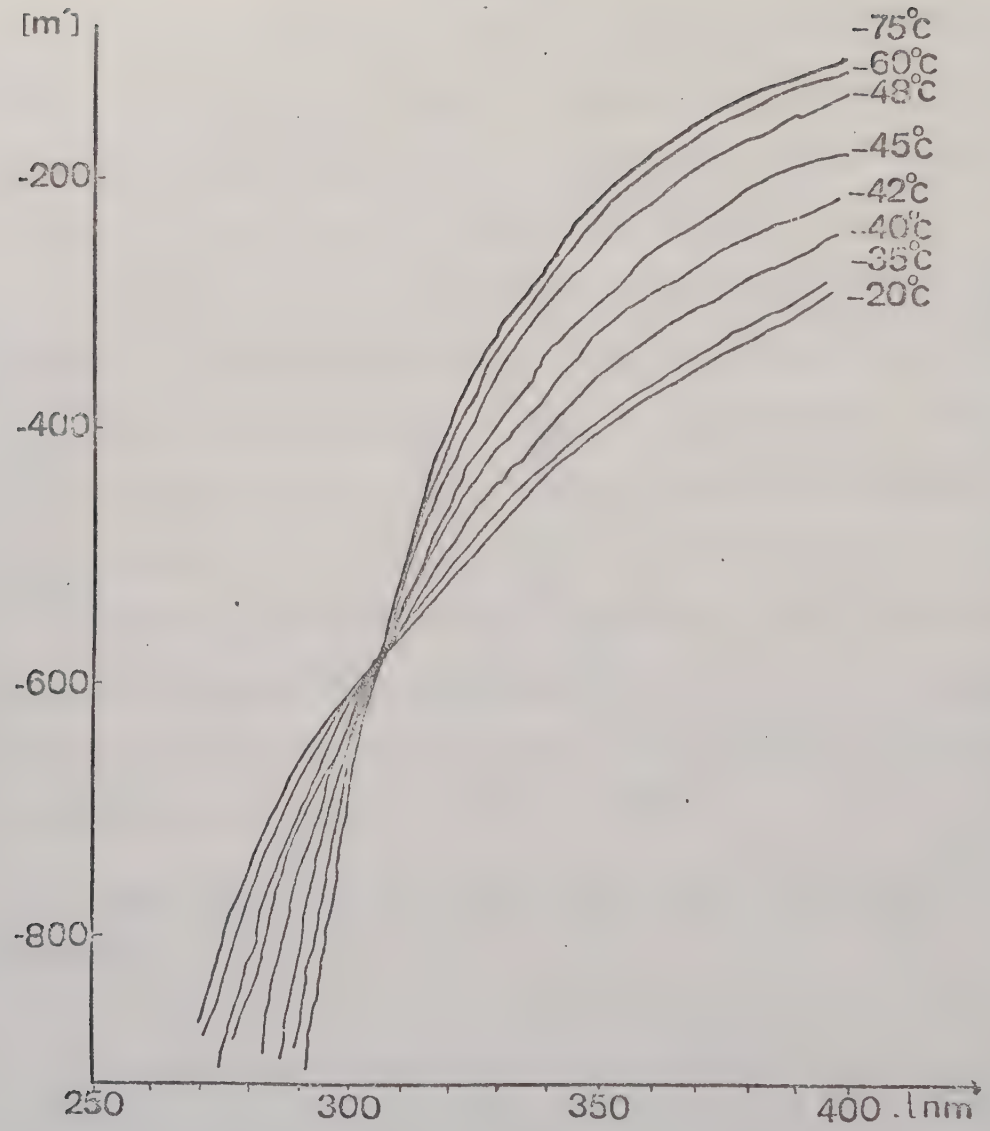


FIGURE 12 : Courbes de dispersion rotatoire, pour différentes températures, d'une solution d'acide poly glutamique (c = 1 mg/ml) dans 70 % de metnanol, paH = 10 à + 20°C.

nue jusqu'à - 30°C. Notons que par rapport au phenomène observé en solution aqueuse cette transition est plus facilement maîtrisée et mieux séparée de la transition désordre-hélice. Nous reviendrons au paragraphe suivant sur la nature éventuelle des liaisons mises en jeu aussi bien que sur l'interprétation du phénomène d'hystérèsis.

IV - LE POLY GLU A PAH > 8 ET A BASSE TEMPERATURE -

1) Résultats .

1.a) Description du phénomène :

Dans 70 % de méthanol, à température ordinaire, pour un paH supérieur à 8 le poly Glu présente un taux d'hélicité pratiquement nul, typique d'une forme étirée. Lorsqu'on diminue la température, dans des limites qui seront précisées et en fonction de facteurs qui seront énumérés.plus loin, l'étude du pouvoir rotatoire de la solution montre que le poly Glu subit une transition de structure importante.

Chaque étape est un état d'équilibre dont on peut enregistrer la courbe de dispersion rotatoire en stabilisant la température pendant la transition (Fig. 12) :

On peut également enregistrer directement la variation de la dispersion rotatoire pour λ = 233 nm en fonction de la température (Figure 13). Augmentant en valeur absolue à partir de - 30°C la dispersion se stabilise vers - 45°C.

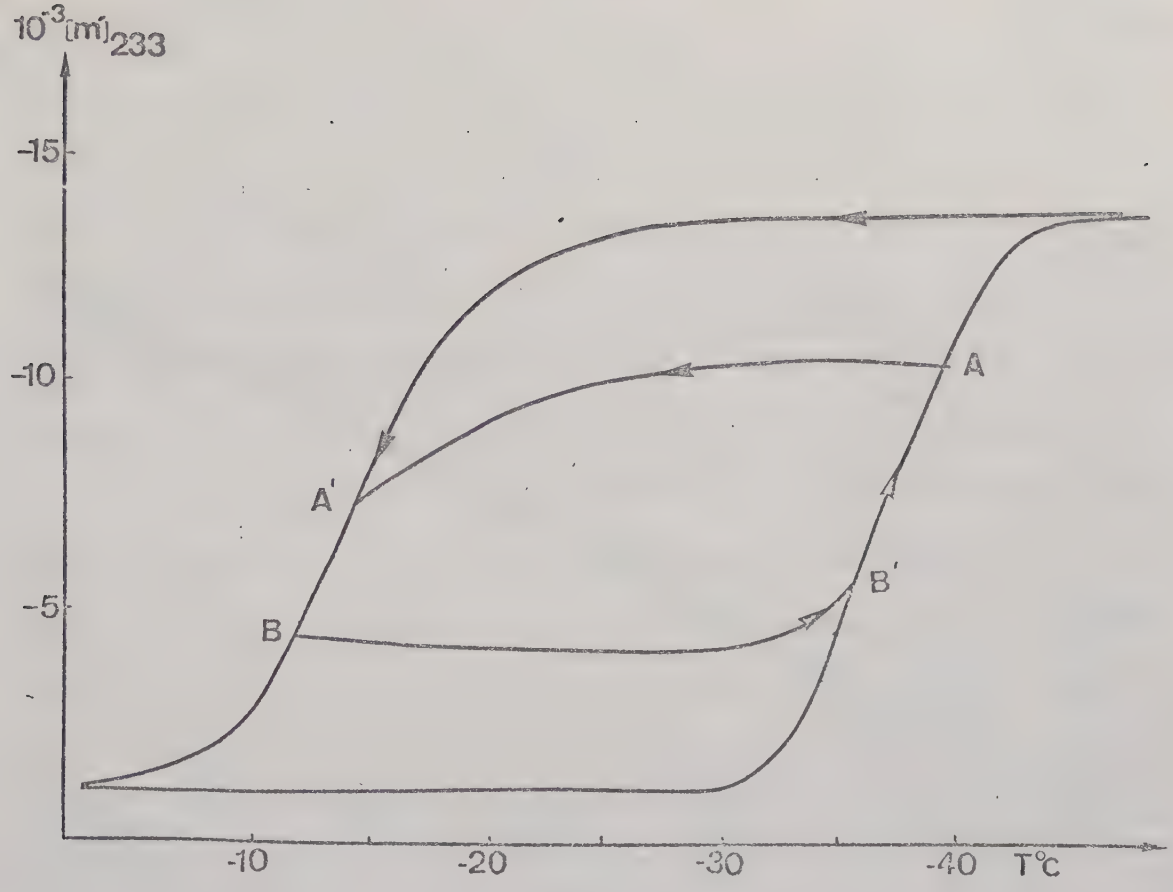


FIGURE 13 : Evolution, en fonction de la température, de la rotation à λ = 233 nm d'une solution d'acide poly glutamique (c = 1 mg/ml) dans 70 % de methanol paH = 10 à + 20°C. Les flèches indiquent le sens de variation de la température. En A le refroidissement est interrompu, on réchauffe jusqu'en A'. En B le réchauffement est interrompu, on refroidit jusqu'en B'.

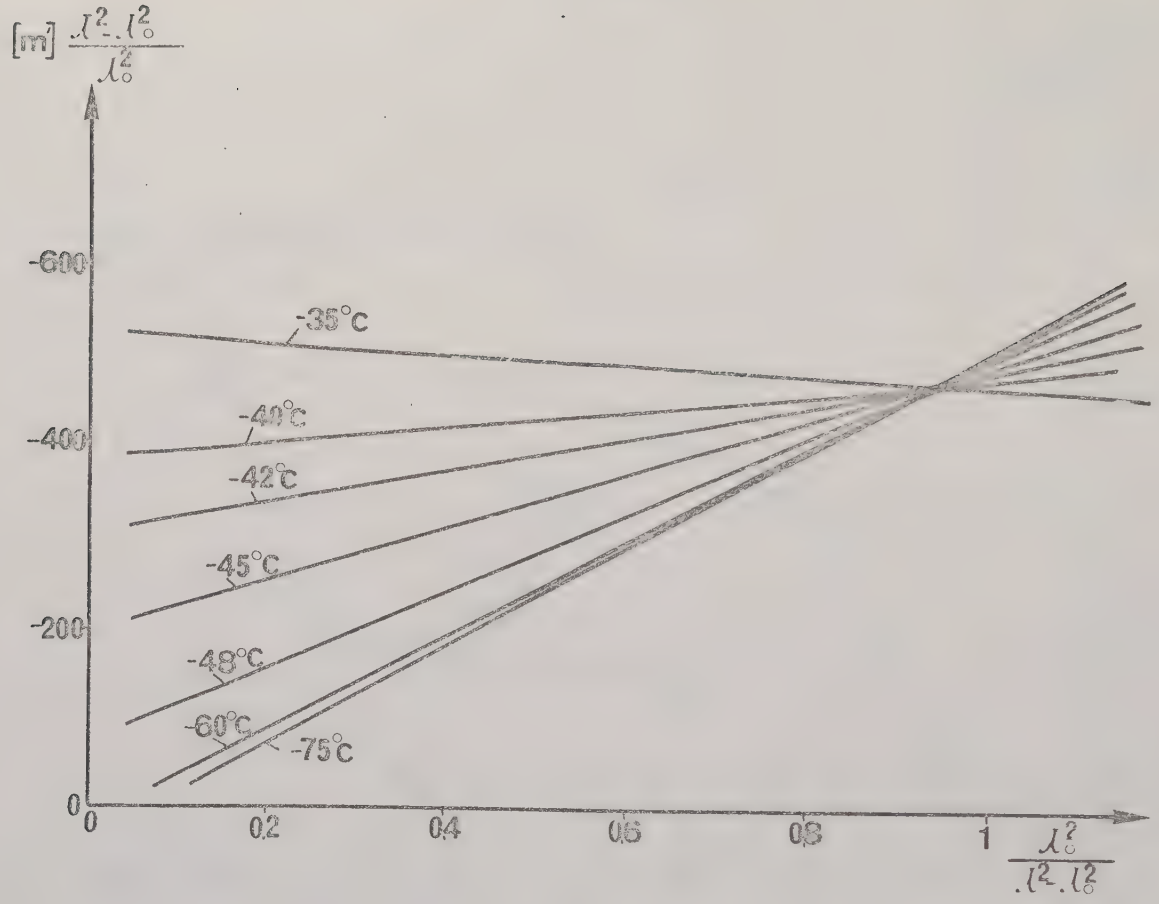


FIGURE 14 : Représentation de Moffit-Yang des courbes de la figure 12.

Lorsqu'on augmente la température, le phénomène est reversible mais pour des valeurs plus élevées de la température constituant ainsi un cycle d'hystérèsis d'à peu près 20°C de "largeur". Si réchauffement ou refroidissement sont inversés en cours de transition, la rotation évolue comme indiqué sur la figure. Ici encore la largeur du cycle est indépendant de la vitesse de variation de température pourvu qu'elle reste faible (1 à 2°C par minute).

En analysant les courbes de la figure 12 par l'équation de Moffit-Yang on obtient le faisceau de droites représenté sur la figure 14 qui permet ainsi de déterminer graphiquement les valeurs de a_o et b_o en fonction de la température qui sont représentées sur la figure 15. On constate que b_o au cours de la transition passe de 0° à - 600° et a_o de - 150° à 1.000°, ils suivent l'un et l'autre le cycle d'hystérèsis décrit plus haut.

1.b) Etude de la viscosité :

La variation de la viscosité intrinsèque $[\eta]$ de solutions de poly Glu dans 70 % de methanol en fonction de la température est représentée sur la figure 16. On constate que $[\eta]$ diminue brusquement entre - 30° et - 40° parallèlement à la variation de α décrite au paragraphe précédent.

Lorsque la remontée en température, $[\eta]$ varie très peu jusqu'à - 20°C épousant le cycle d'hystérèsis décrit précédemment. Au-delà de - 20°C la viscosité globale de la solution devient trop faible pour être mesurée avec notre appareil.

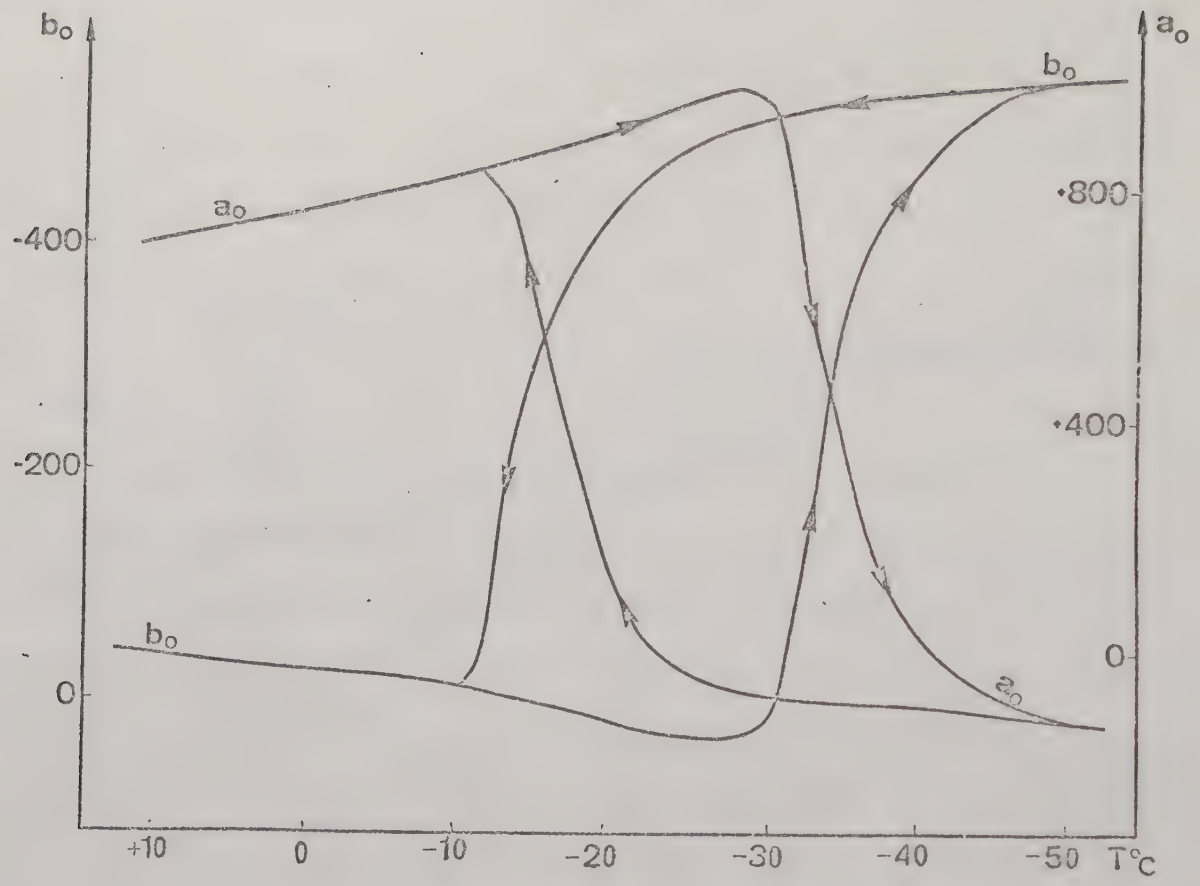


FIGURE 15 : Variation, en fonction de la température, des paramètres a_o et b_o d'une solution d'acide poly glutamique dans 70 % de methanol paH = 10 à + 20°C, déterminés d'après la figure 14. Les flèches indiquent le sens de variation de la température.

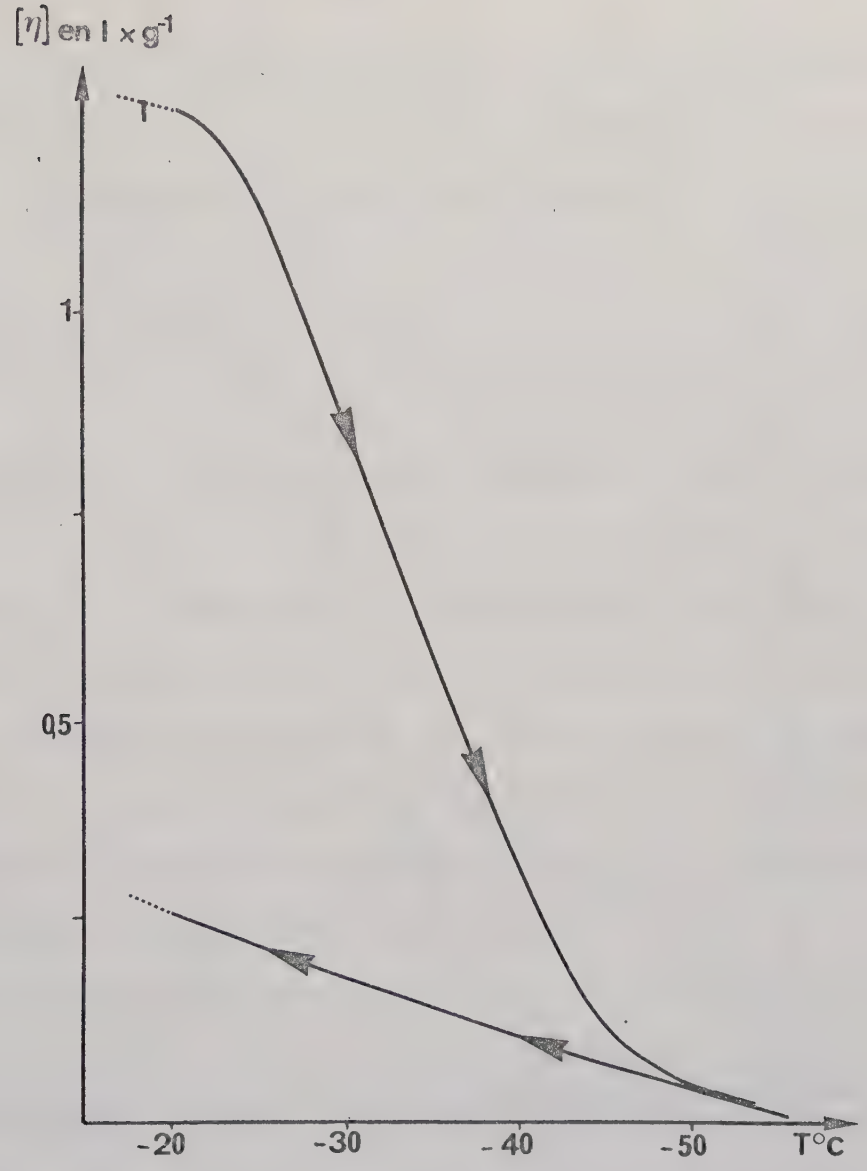


FIGURE 16 : Variation, en fonction de la température, de la viscosité intrinsèque d'une solution d'acide poly glutamique dans 70 % de methanol paH = 10 à + 20°C. Les flèches indiquent le sens de variation de la température.

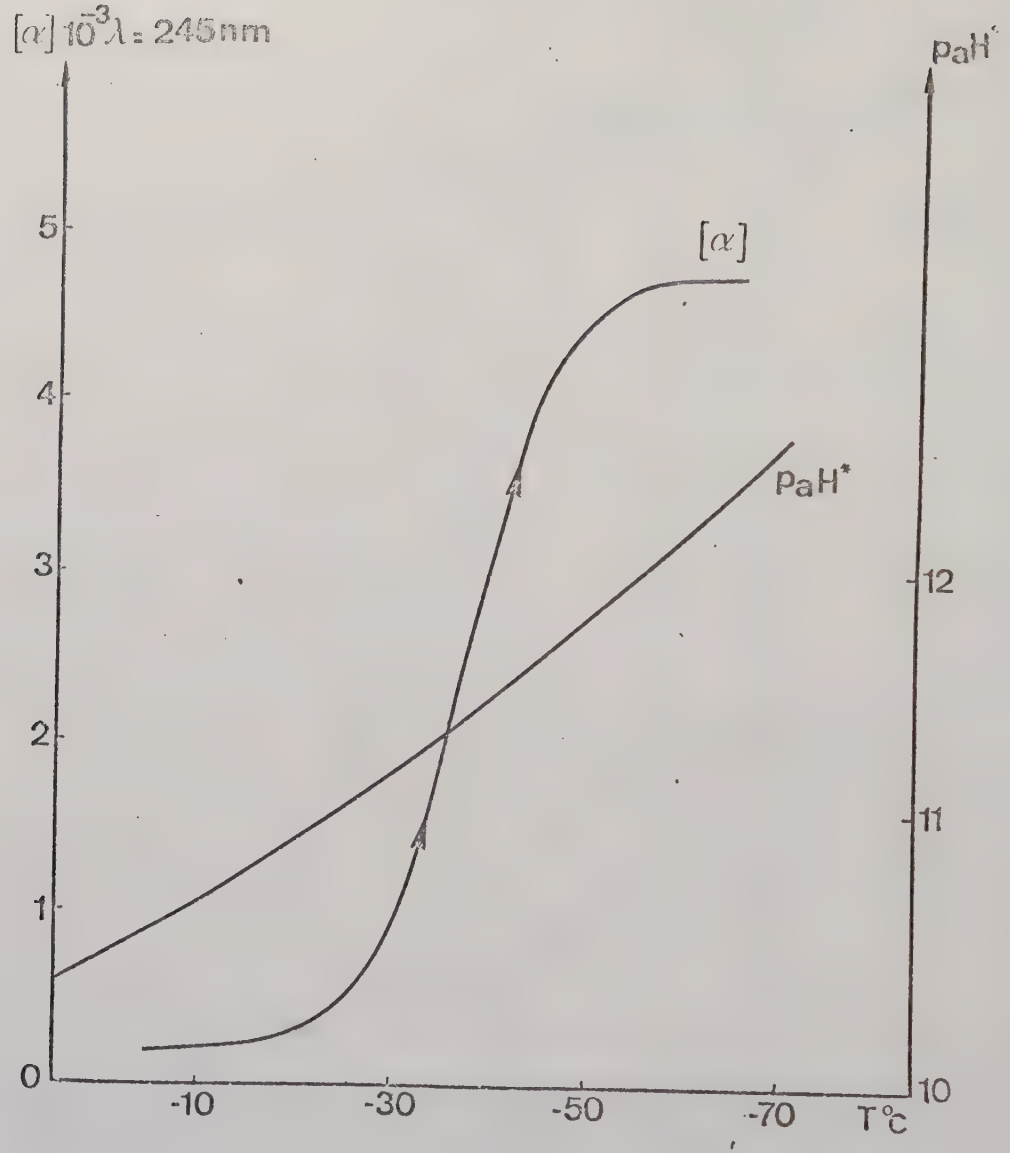


FIGURE 17 : Variations parallèles de la rotation optique et de l'activité protonique, en fonction de la température, d'une solution d'acide poly glutamique (c = 1 mg/ml) dans 70 % de methanol paH = 10 à + 20°C.

Cependant, à partir de la température ambiante, un nouveau refroidissement détermine la même loi de décroissance de [?] preuve que le cycle d'hystérèsis existe effectivement.

1.c) Influence du paH :

Nous avons indiqué dans le chapitre 1 que l'activité protonique d'une solution hydro-organique peut varier notablement en fonction de la température. Il était donc intéressant de suivre son évolution pendant la transition décrite ci-dessus.

On utilise une solution de 70 % de méthanol contenant le poly Glu (c = 1 mg/cc) avec un indicateur, le parachlorophenol 5.10^{-5}M, étalonné suivant la méthode indiquée au chapitre 1, le paH de départ est ajusté avec de la soude.

Par spectrophotométrie on suit, en fonction de la température, l'évolution de l'indicateur ce qui permet de connaître la loi paH = f (T), puis sur la même solution on suit par spectropolarimétrie α = f (T) après avoir vérifié sur une solution témoin que la présence de l'indicateur ne modifiait pas le comportement du polymère. On notera que α est suivi à λ = 245 nm et non à 233 nm à cause de l'absorption forte de l'indicateur.

Sur la figure 17 sont représentés, pour un paH initial à + 20°C de 10, les variations simultanées de α et de paH : on constate que celui-ci varie de manière monotone, correction faite bien entendu de la variation propre de l'indicateur.

Cette expérience a été reproduite pour plusieurs valeurs de paH initial à + 20°C : on constate que la loi de variation paH = f (T) reste la même, simplement la courbe subit une translation égale à celle du paH initial. Cependant si le paH initial augmente la température de transition T 1/2 du poly Glu diminue en même temps que la largeur du cycle (Δ T) augmente. Ces résultats sont représentés sur le tableau ci-dessous :

paH initial + 20°C	10	10,5	11
$T_{1/2}$	- 35°C	- 50°C	- 60°C
ΔT	25°	30°	35°C
$paH_{1/2}$	11,4	12,5	13

En conclusion le paH varie de manière notable pendant la transition, cependant celle-ci ne se produit pas pour une valeur donnée de paH.

1.d) Influence de la concentration :

Lorsqu'on utilise des concentrations supérieures à 0,5 mg/ml le phénomène décrit précédemment semble indépendant de la concentration pour une valeur de paH de départ donné.

Si la concentration diminue, la température de transition devient très basse puis inacessible, d'une part à cause de la congélation éventuelle du solvant et d'autre part à cause de la limite de sensibilité du spectropolarimètre. Sur la figure 18 nous avons représenté la variation de T 1/2, température de demi-transition, en fonction de la concentration en polypeptides, on constate qu'elle tend vers 0°K quand c $\longrightarrow$ o.

1.e) Influence du solvant :

Lorsqu'on utilise seulement 50 % de méthanol la transition invoquée au paragraphe II est située à plus bas paH (6,2 au lieu de 7 pour 70 % de méthanol).

Cependant lorsqu'on élève le paH pour obtenir une transition semblable à celle obtenue dans 70 % de méthanol nous n'observons que le début, étant limité par le point de congélation de la solution (- 55°C).

Si on utilise 50 % d'éthylèneglycol quelque soit le paH de la solution on ne peut observer un phénomène analogue avant la congélation(- 50°C).

2) Discussion .

2.a) Interprétation de la transition :

La valeur élevée du paH (supérieure à 10), la dépendance avec la concentration et enfin l'existence du cycle d'hystérèse

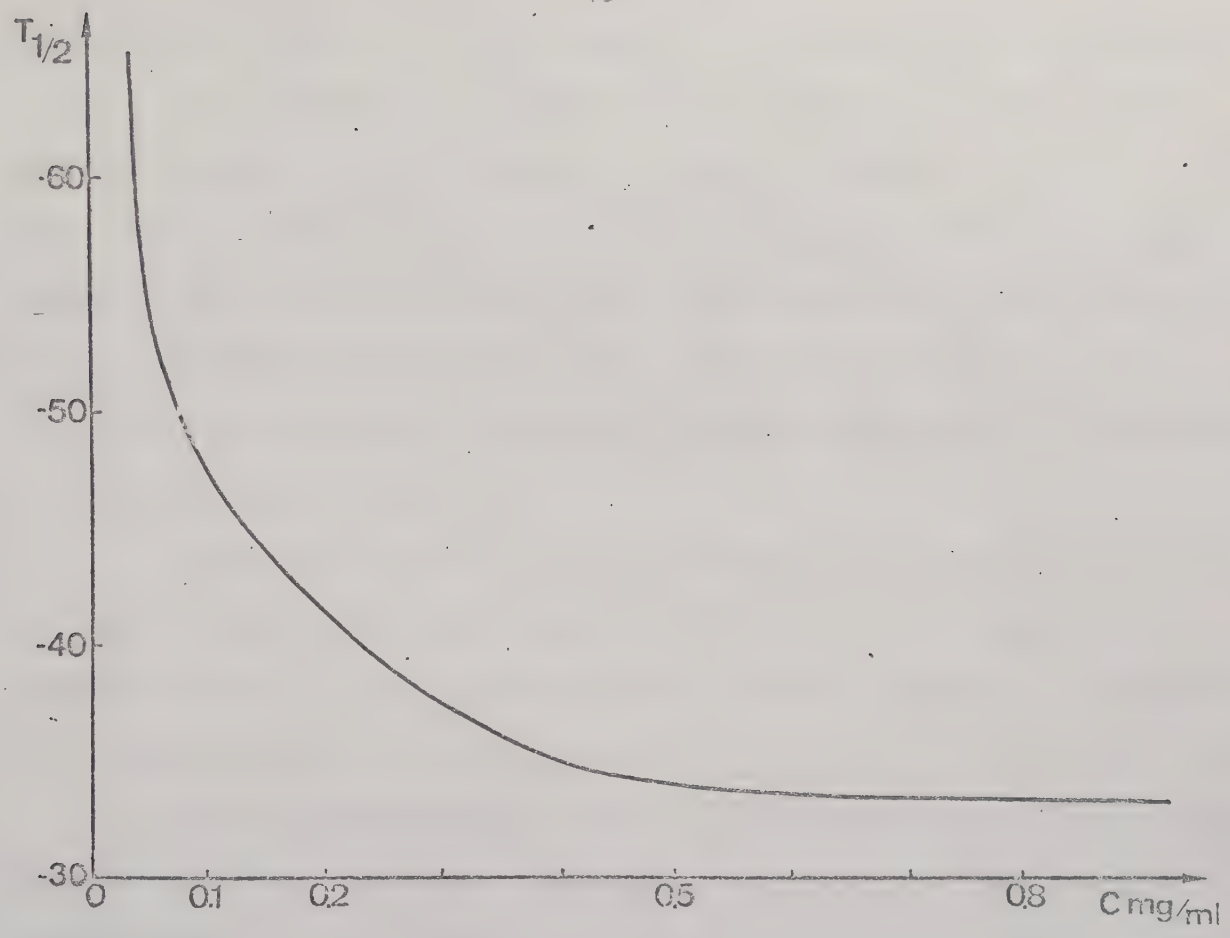


FIGURE 18 : Variation, en fonction de la concentration en polymère, de la température de demi-transition de solutions d'acide poly glutamique dans 70 % de methanol pH = 10 à + 20°C.

empêchent de conclure à une simple transition désordre-hélice.

Le paramètre b_o passe de 0° à environ - 600°, comme il a été admis il est justifié de dire qu'entre - 30°C et - 40°C pour paH à + 20°C égal à 10 le poly Glu passe d'une structure étirée à une structure en hélice. Cependant la forte variation de a_o, la disparition aux basses concentrations ainsi que la présence du phénomène d'hystérèse semble indiquer qu'il se produit une agrégation.

Lorsqu'on diminue la concentration l'agrégation disparaît mais également le passage à la forme hélice aussi il est probable que c'est l'agrégation des formes étirées qui produit le changement de structure.

Nous avons indiqué dans le chapitre 1 que la viscosité intrinsèque d'un polymère, assimilé à un ellypsoïde, pouvait se représenter par la formule :

$[\eta] = K \left(\frac{a}{b}\right)^{\alpha} \frac{4}{3} ab^2 \frac{1}{M}$. $\underline{a}$ et $\underline{b}$ étant respectivement le grand axe et le petit axe de l'ellipsoïde servant de modèle. La valeur de α est chiffrée aux environs de 1,8. Bien que nos conditions soient particulières nous maintiendrons cette hypothèse, alors la viscosité est de la forme :

$$[\eta] = K' \frac{a^{2,8}\, b^{0,2}}{M}$$

Dans notre hypothèse de l'agrégation $\underline{b}$ augmente et M également proportionnellement à $\underline{b}^2$ alors que $\underline{a}$ reste constant, compte tenu des exposants, $[\eta]$ diminue lors de l'agrégation ce

qui est bien notre résultat. Ainsi l'étude de la viscosité n'apporte aucune indication supplémentaire mais appuie notre hypothèse de l'agrégation.

La transition ne se produit pas pour une valeur de paH donnée qui n'est donc pas un facteur déterminant cependant, lorsqu'on augmente le paH de départ la transition se produit à plus basse température probablement à cause des répulsions électrostatiques qui défavorisent l'agrégation.

2.b) Nature des liaisons mises en jeu :

Lors des intéractions entre macromolécules biologiques en solution il semble que les liaisons qualifiées d'hydrophobes (30) jouent un rôle fondamental et interviennent probablement dans les phénomènes décrits précedemment bien qu'il s'agisse de polyelectrolytes.

Ce type de liaison résulte de l'interaction de groupements non polaires, appartenant à la même molécule ou à deux molécules différentes, et allant dans le sens d'une diminution du nombre de sites au contact du solvant. Il semble que le mode de liaison le plus important soit du type Van der Waals. Les autres modes, liaisons hydrogènes, liaisons ioniques n'interviennent que pour une faible part dans les édifices qui nous intéressent.

L'eau joue un rôle fondamental et privilégié qui tient probablement à la très forte cohésion de ce solvant du fait de sa très grande facilité à former des liaisons hydrogènes.

On admet que l'eau forme des cages autour des groupements non polaires, sa structure est alors différente de celle de l'eau libre, lorsque deux groupements non polaires se réunissent il y a remaniement de la gaine de solvatation allant vers sa diminution. Certains auteurs (31) pensent que la gaine aqueuse de solvatation reste inchangée lors de la congélation.

Les solvants organiques ajoutés aux solutions aqueuses diminuent la possibilité de liaisons hydrophobes donc risquent d'altérer les structures des macromolécules ou d'empêcher la formation d'édifices moleculaires : ceci se traduit en terme thermodynamique par une augmentation de l'entropie de structure, le méthanol est considéré comme un des plus actif sur un point (31).

La diminution de la température rétablit des conditions favorables aux interactions hydrophobes altérées par l'addition, à température ordinaire, du solvant organique. En effet la constante dielectrique augmente et se rapproche de celle de l'eau, d'autre part l'entropie de structure diminue et compense l'augmentation néfaste citée plus haut.

Les conditions favorables étant rétablies la diminution globale de l'entropie du milieu facilite l'établissement de liaisons entre molécules, édifices qui seraient instables à température ordinaire.

Remarquons que si l'addition de solvant organique à température ordinaire altère la structure du biopolymère étudié il suffit de diminuer lentement la température en même temps que l'on ajoute le solvant de manière a compenser les effets ci-dessus,

cette méthode est employée pour étudier certaines enzymes à basse température.

2.c) Le cycle d'hystérèsis :

Lorsqu'on obtient à basse température la forme structurée et agrégée du poly Glu, celle-ci reste stable à une température très supérieure à celle de sa formation : ceci est la caractéristique d'un phénomène d'hystérèsis. Dans notre laboratoire d'autres cas ont déjà été mis en évidence sur des colorants du type cyanine (32) ou bleu de Wurster (33) : en solution dans le méthanol ces molécules s'associent à basse température et en remontant présente un phénomène d'hystérèse.

Si en cours de transition on inverse le sens de variation de température on obtient les cycles partiels de la fig.13, ce comportement n'attire guère de commentaire, on peut le qualifier de normal si on prend comme référence certains phénomènes physiques bien connus comme par exemple l'aimantation induite du fer.

Sur la figure 19 est représentée l'interprétation thermodynamique d'un phénomène d'hystérèse (34). Il s'agit d'un diagramme de phase classique : le paramètre extensif (dans notre cas la structure) en fonction d'un paramètre intensif (pour nous la température). Théoriquement la transition de phase entre deux états A et B stables a lieu pour une valeur bien déterminée du paramètre intensif et on obtient la droite marquée transition thermodynamiquement stable, c'est le cas par exemple de la fusion

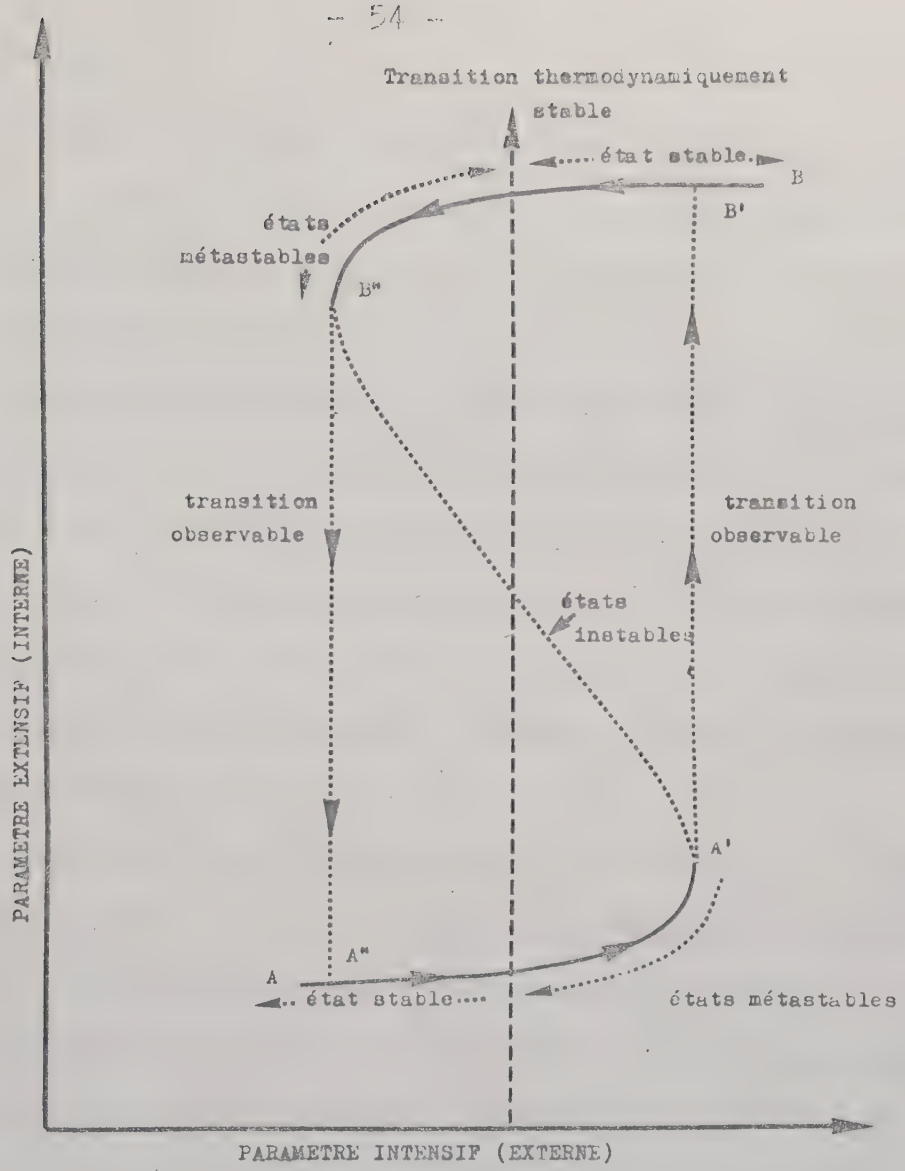


FIGURE 19 : Représentation théorique d'un cycle d'hystérèse accompagnant un changement de phase, d'après KATCHALSKY et OPLATKA (34).

des corps purs.

En fait dans bon nombre de cas on passe de l'état A à l'état B par toute une série d'états instables, matérialisés schématiquement par la courbe A'B", précédés et suivis par une série d'états métastables A"A' et B"B'.

Expérimentalement les états instables de la portion A'B" ne peuvent pas être atteints aussi lorsqu'on arrive en A' on bascule directement dans l'état B et de même de B" à A". Ainsi ces états métastables prolongeant les états thermodynamiques stables A et B décalent la transition de part et d'autre de la transition thermodynamique idéale donnant naissance au cycle d'hystérèse.

Dans notre cas l'état A est constitué par le poly Glu sous forme étirée, la forme B est constituée par le poly Glu agrégé sous forme hélice. La structure hélice n'est pas thermodynamiquement stable dans ces conditions mais l'agrégation la maintient en état de contrainte constituant l'état métastable responsable du phénomène d'hystérèse.

V - AUTRES POLYPEPTIDES -

La poly Lysine appartient aux polypeptides basiques, en solution aqueuse à pH 11 elle est sous forme hélice cependant qu'à ce même pH après chauffage à 50°C elle prend la forme β c'est-à-dire une structure plissée avec structure tertiaire plane antiparallèle (35).

Pour des pH plus faible la poly Lysine se trouve sous forme étirée évoquée pour le poly Glu (27). Nous l'avons expérimentée dans ces conditions à paH = 7,5 dans 70 % de methanol. Lorsqu'on abaisse la température de cette solution entre 0° et - 70° le paramètre d'helicité b_o passe de 0 à - 600° (Fig. 20) compte tenu de la valeur de paH très inférieure au passage normal de la forme étirée à la forme hélice nous nous trouvons dans le cas du poly Glu, à savoir une agrégation des molécules étirées entraînant un passage à la forme hélice.

La poly Arginine dans les mêmes conditions donne un phénomène du même type et nous pensons que tous les polypeptides solubles dans nos conditions sont susceptibles de présenter un phénomène semblable au poly Glu pourvu que la gamme de paH soit convenablement choisie.

Signalons que lors de l'expérimentation d'enzymes à basse température en solution hydro-organique selon la protéine, le paH et la force ionique on obtient assez fréquemment une agrégation reversible conduisant à des cryoformes plus ou moins solubles.

Ce phénomène probablement du même type que ceux évoqués précédemment est gênant lorsqu'il s'agit d'étudier l'activité des enzymes à basse température mais peut présenter un intérêt certain lorsqu'il s'agit d'étudier les interactions entre protéines.

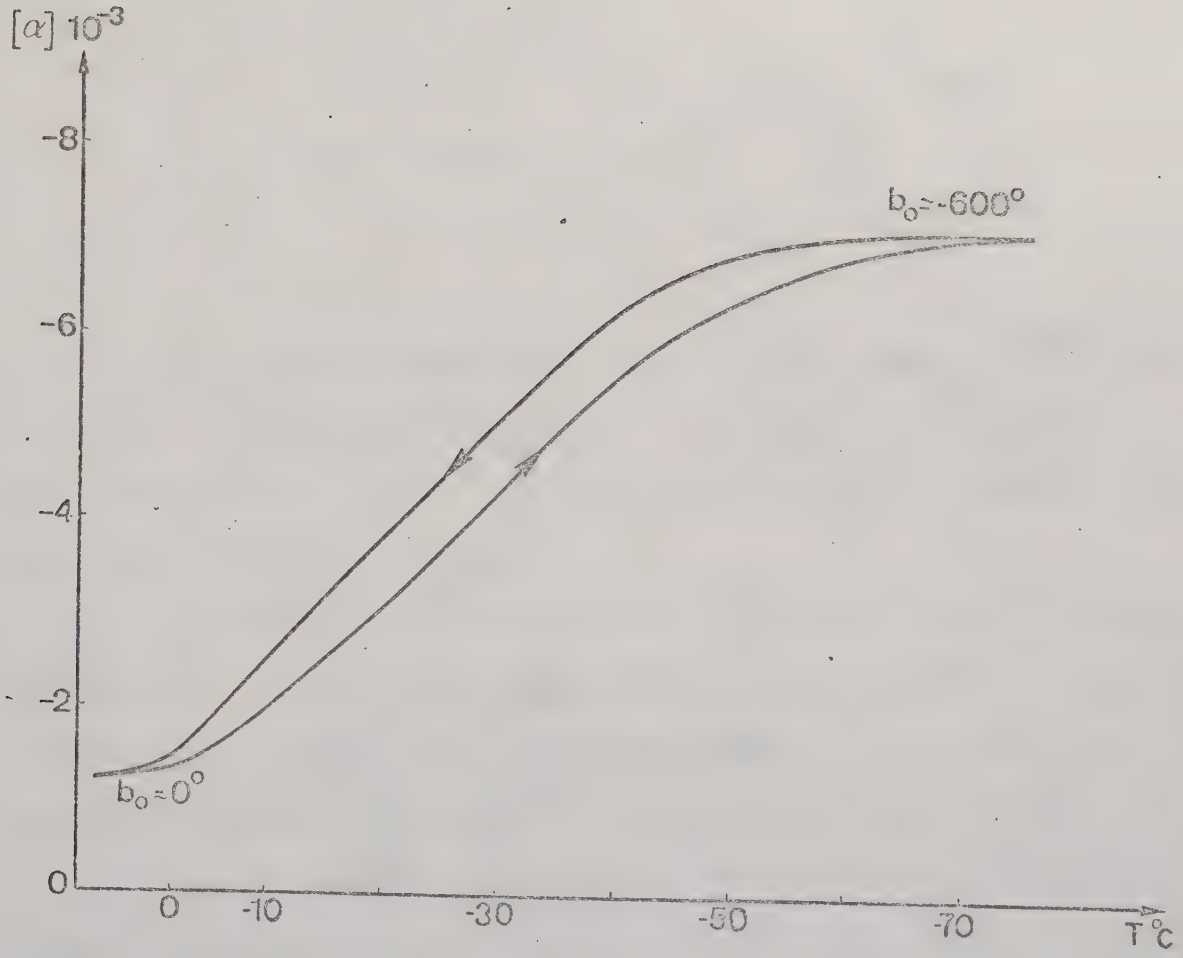


FIGURE 20 : Variations, en fonction de la température, du paramètre d'hélicité b_o d'une solution de poly Lysine (c = 1 mg/ml) dans 70 % de methanol paH = 7,5 à + 20°C.

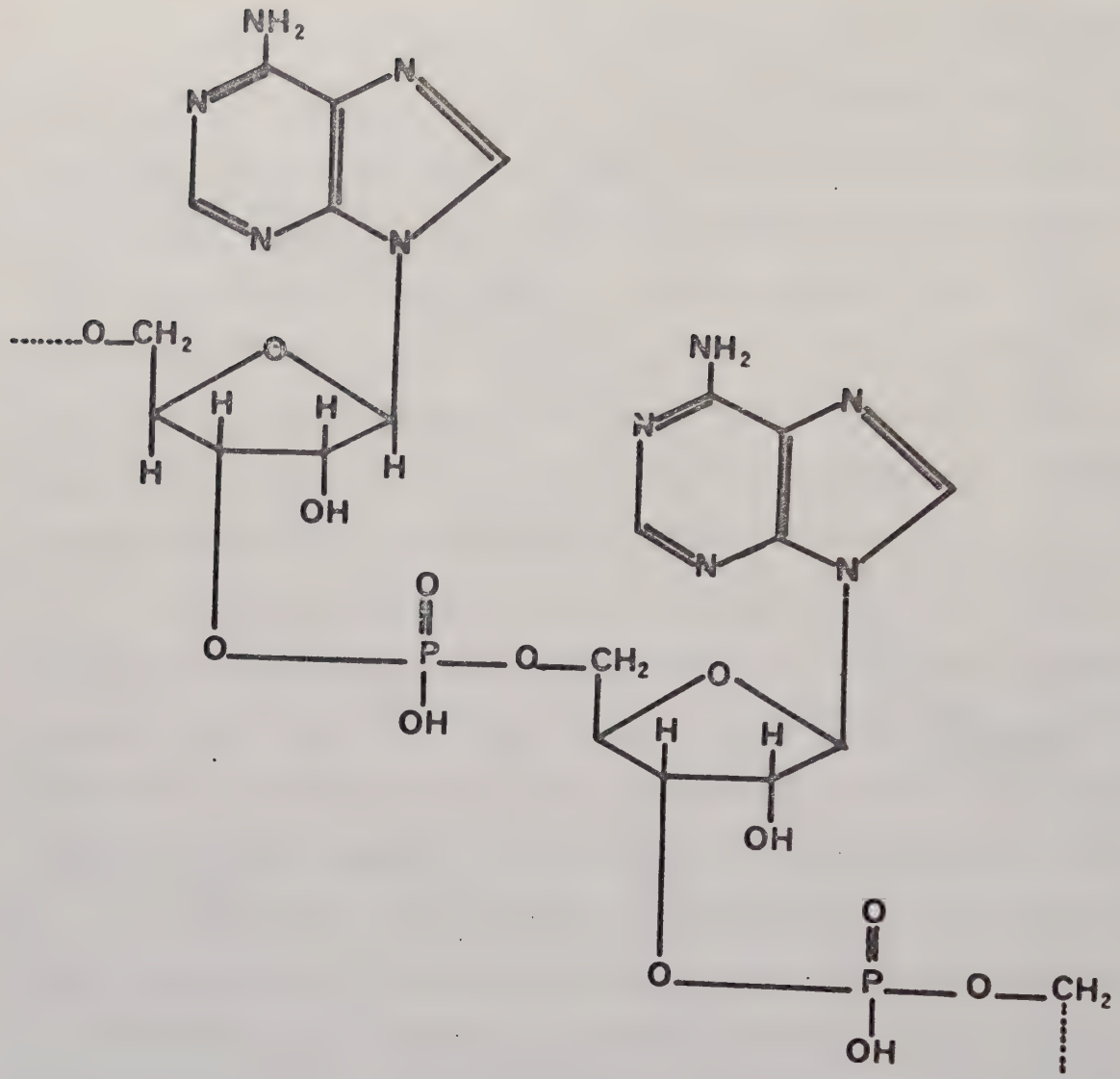


Figure 21 : Schéma de la polymérisation de l'acide adénylique.

- CHAPITRE 3 -

LES POLYNUCLEOTIDES

Le nucleotide, unité de base des acides nucléiques, est constitué d'une base purique ou pyrimidique a laquelle est rattaché par un lien glycosidique, un sucre combiné à une molécule d'acide phosphorique.

On trouve deux types de nucleotides dans les acides nucleiques : l'un contient le D-ribose et l'autre le 2-desoxy-ribose qui donnent leur nom respectivement à l'acide ribo-nucleique (ARN) et à l'acide dexoxyribonucleique (ADN).

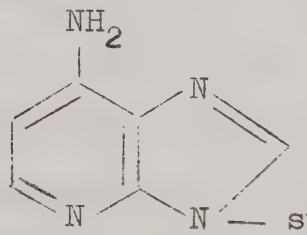
La polymérisation des nucleotides par liaison entre l'acide phosphorique de l'un et le sucre d'un autre donne un polynucleotide. Ces corps que l'on obtient par synthèse constituent évidemment des modèles précieux pour élucider les propriétés aussi bien structurales que chimiques des acides nucleiques. Ils ont fait l'objet de très nombreuses études par des techniques variées (36) et ici est envisagée l'étude de leur comportement structural en solution hydro-organique et à basse température.

Nous avons choisi quelques exemples typiques représentatifs des différentes structures que l'on rencontre dans les polynucleotides.

I- LES SOLUTIONS -

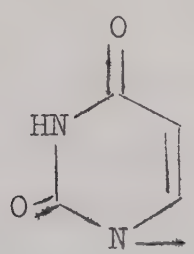
Nous avons utilisé les polymères suivants :

1) l'acide polyriboadenylique : poly A provenant de la polymérisation de l'acide adenylique.

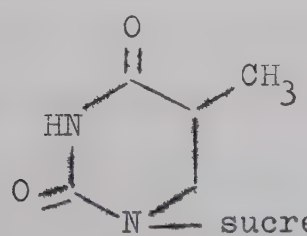


Sa polymérisation est représentée sur la figure 21, schéma qui rend compte également des polymères suivants.

2) l'acide polyribouridilique : poly U provenant de la polymérisation de l'acide uridylique.



3) l'acide polyribothymidylique : poly T provenant de la polymérisation de l'acide thymidylique.



4) Copolymères r AT et r AU, ces corps sont constitués par une chaîne où alternent les acides correspondants soit A et T, soit A et U.

Le poly A, le poly U, le poly T sont obtenus par polymérisation enzymatique utilisant la polynucleotide phosphorylase (37). Les polymères alternés sont obtenus par l'ARN polymerase en utilisant le poly d AT comme matrice (38). Tous ces produits ont été préparés dans le laboratoire de A.M. MICHELSON sauf le poly r AT qui est un don du Dr. E. REICH.

Les produits sont conservés en solution mère concentrée (plusieurs mg/ml) dans le tampon cacodylate 0,15 M pH 7. Au moment de l'utilisation ils sont dilués en phase aqueuse puis on ajoute lentement le solvant organique en quantité variable, la concentration finale étant ajustée pour obtenir une densité optique voisine de 1 à 260 nm.

L'expérience a montré que en présence d'une force ionique notable à basse température les polynucleotides précipitent aussi toutes les expériences relatées ici sont faites en solution très pauvre en sel.

Les poly A et poly T admettent facilement des pourcentages élevés de methanol (jusqu'à 80 %) alors que le poly U ne permet d'obtenir des solutions limpides à basse température qu'en dessous de 60 % de methanol.

Toutes les solutions utilisées ici ont un paH restant voisin de la neutralité. Une étude systématique de l'influence de ce facteur sur chacun des polymères n'est pas envisagée dans le cadre du travail présenté ici.

II - RESULTATS ET DISCUSSION -

1. Etude du poly A .

1.a. Comportement en solution aqueuse :

A pH acide le poly A présente une structure en hélice formée de deux brins parallèles stabilisés d'une part par des liaisons hydrogène et d'autre part par attraction électrostatique entre les adenines chargées positivement et les groupements phosphates de la chaîne opposée (39), la structure se dissocie coopérativement à une température caractéristique, T_m (40)(41).

A pH neutre le poly A a une conformation en simple brin partiellement hélicoïdal où n'interviennent pas les liaisons hydrogène. Une élévation de température détruit cette forme de façon non coopérative entre 0°C et 100°C pour 0,15 M Na^+, cette transition a été étudiée par différentes techniques : absorption (42) DRO (43) et dichroïsme circulaire (44).

C'est cette structure en simple brin que nous avons choisi en premier pour expérimenter en présence de methanol.

1.b. Comportement en présence de methanol :

Comme il est représenté sur la figure 22 en absence de sel mais avec 50 % de methanol il y a un déplacement relativement faible de la transition non coopérative entre la structure ordonnée et désordonnée. La transition conserve son caractère non coopératif avec un faible déplacement du T_m (35°C au

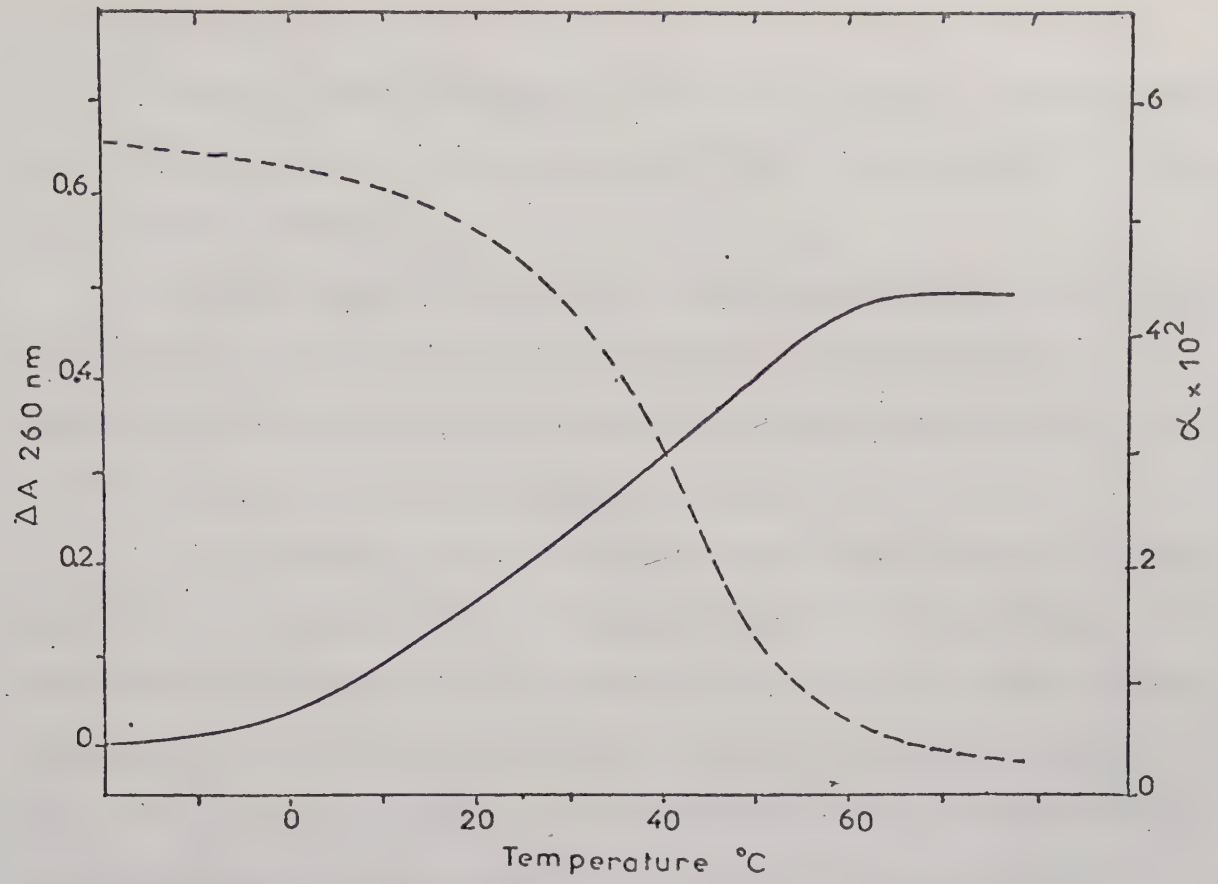


FIGURE 22 : Variation de l'absorption à 260 nm (_____) et de la rotation optique à 282 nm (- - - -) du poly A (A_{260} = 1.4 à +20°C) en fonction de la température dans 50°/₀ de méthanol.

lieu de 45°C).

On note une divergence entre les courbes d'absorption et de dispersion rotatoire qui avait déjà été observée en solution aqueuse normale.

En appliquant la méthode classique de Van't Hoff pour déterminer ΔH on trouve 11,9 Kcal/mole en absorption et 12,5 Kcal/mole en DRO alors qu'on obtenait respectivement 13,5 et 8,5 Kcal/mole en solution aqueuse à pH 7.

Il apparaît que le methanol dans cette gamme de concentration a un petit effet destabilisant sur l'empilement des bases d'un polynucleotide à simple brin. L'effet général reste faible ce qui montre le caractère particulier des liaisons mises en jeu qui ne sont probablement pas du type hydrophobe. En abaissant la température on ne détecte aucun phénomène.

2 . Etude du poly U .

LIPSETT (45) a la premiere décrit la transition désordre ⟷ ordre du poly U qui apparaît entre + 10°C et 0°C en solution aqueuse suivant le contenu ionique, elle a noté particulièrement une forte influence du magnésium qui facilite le passage à une forme d'hélicité importante.

En dehors de ce T_m assez bas le poly U a montré un caractère particulier vis-à-vis des alcools qui augmentent la stabilité de la forme ordonnée contrairement à d'autres polynucleotides comme le poly C (46).

Dans cette même étude il est montré que les ions K^+ augmentent le T_m plus que les ions Na^+, cette sélectivité vis-à-vis d'ions monovalents constitue également une particularité de ce polynucleotide.

Des études récentes faisant appel aux techniques d'ultracentrifugation et de viscosité (47)(48) conduisent a l'hypothèse d'une structure ordonnée anti-parallèle en épingle à cheveu formée donc à partir d'une seule molécule qui peut ensuite donner un phénomène d'agrégation.

La faible stabilité thermique du poly U en fait un cas particulièrement adapté a notre technique des basses températures. Deux paramètres sont intéressants à suivre, le T_m et le pourcentage d'hypochromicité accompagnant la structuration et ceci en fonction de trois grandeurs : la force ionique, le pourcentage en methanol et la concentration en polymère.

2.a. Influence du methanol :

A pH 7 et pour une concentration de 0,5 M en NaCl le poly U a un T_m de + 3°C pour une hypochromicité de 30 % ces conditions seront prises comme référence. Lorsque la force ionique est abaissée à 10^{-1}M, la transition est moins coopérative et bien qu'elle soit interrompue par la congélation on peut évaluer le T_m à - 3°C. Lorsqu'on ajoute 20 % de methanol à la solution précédente le T_m remonte à + 1°C ce qui est conforme à des résultats antérieurs (46) cependant que la coopérativité initiale est rétablie. Ces résultats sont représentés sur la figure 23.

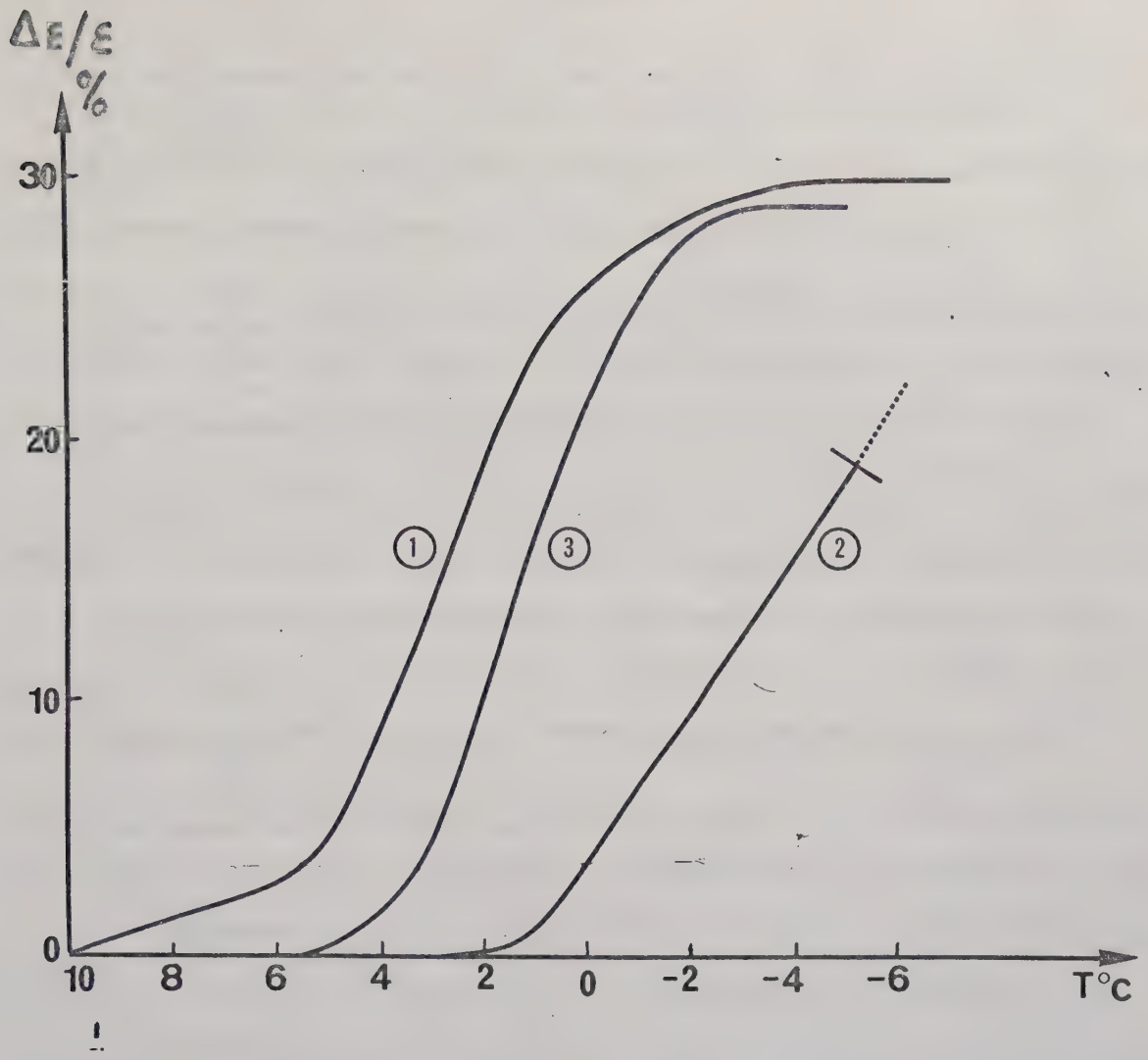


FIGURE 23 : Pourcentage d'hypochromicité à 260 nm, en fonction de la température, du poly U : 1 tampon cacodilate pH 7 0.6 M Na^+, 2-même tampon 0.1M Na^+, 3-idem 2 plus 20% de méthanol. (A_{260} = 0.8 à + 20°C).

% methanol	$[Na^+]$	T_m °C	$\frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon}$ %
0	5.10^{-1}	+ 3	30
0	10^{-1}	- 2	-
20 %	8.10^{-2}	+ 1	27,5
20 %	$1,05.10^{-2}$	- 10	28
30 %	$0,9.5.10^{-2}$	- 9	29
30 %	6.10^{-3}	- 12	30
40 %	$5.5.10^{-3}$	- 11	29
40 %	$3.7.10^{-3}$	- 16	28
50 %	$2.5.10^{-3}$	- 18	25
50 %	$2.5.10^{-4}$	- 33,5	20

Tableau I : Paramètres de la transition du poly U (A_{260} = 0,5) en fonction du % en methanol et de $[Na^+]$.

Notre but est d'arriver à un pourcentage élevé de methanol et une force ionique faible, aussi nous avons augmenté progressivement jusqu'à 50 % la proportion d'alcool en même temps que la concentration en Na^+ est abaissée. L'ensemble de résultats est figuré sur le tableau I cependant que les étapes principales sont représentées sur la figure 24.

On constate que le T_m diminue régulièrement en même temps que la force ionique (nous reviendrons précisément sur ce point au paragraphe suivant) cependant que les ajouts de methanol augmentent la stabilité : lorsque la concentration en Na^+ passe de 10^{-2} à $5.5.10^{-3}$ l'augmentation du methanol de 20 % à 40 % maintient le T_m entre - 10°C et - 11°C. Il semble donc que le methanol compense la diminution de force ionique.

La coopérativité entre $[Na^+] = 0,5$ M sans methanol, et $[Na^+] = 2,5.10^{-4}$ avec 50 % de methanol, est sensiblement conservée (figure 24). Entre ces deux extrêmes le pourcentage d'hypochromicité tombe de 30 % à 20 %, sans modification globale de la transition, il est donc raisonnable de faire l'hypothèse qu'en présence de 50 % de methanol et à très faible force ionique la transition observée est de même nature que celle s'effectuant dans les conditions usuelles. La baisse d'hypochromicité observée est due à la présence de methanol aussi bien par un effet purement spectroscopique que peut-être par une diminution relativement faible de l'interaction des bases dans la structure ordonnée.

Dans la transition à basse température en présence de 50 % de methanol on observe un faible phénomène d'hystérèse de quelques degrés. Cependant il dépend de l'échantillon utilisé

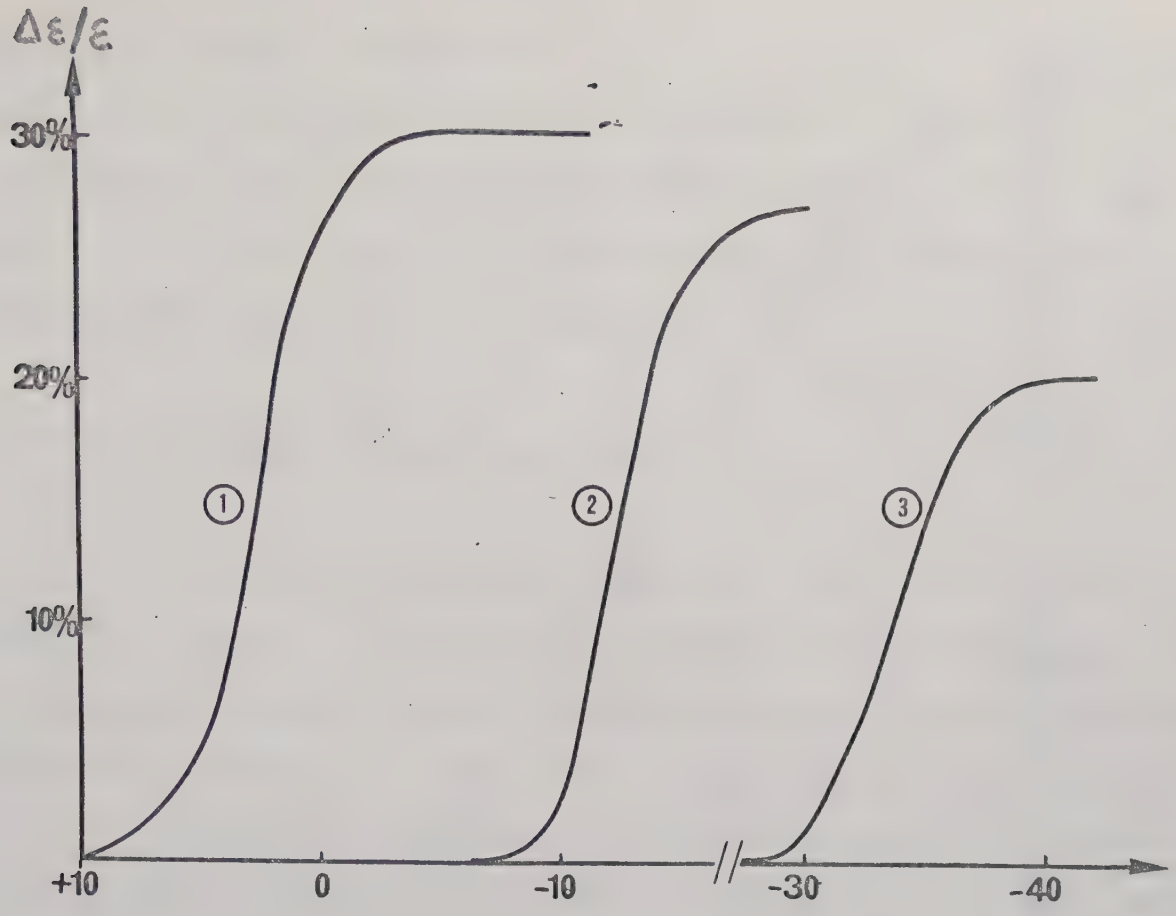


FIGURE 24 : Pourcentage d'hypochromicité à 260nm, en fonction de la température, du poly U (A_{260} = 0.8 à + 20°C) : 1-tampon cacodilate pH 7, 0.6M Na^+, 2-40% de méthanol 510^{-3}M Na^+, 3-50% méthanol 2.510^{-4} M Na^+.

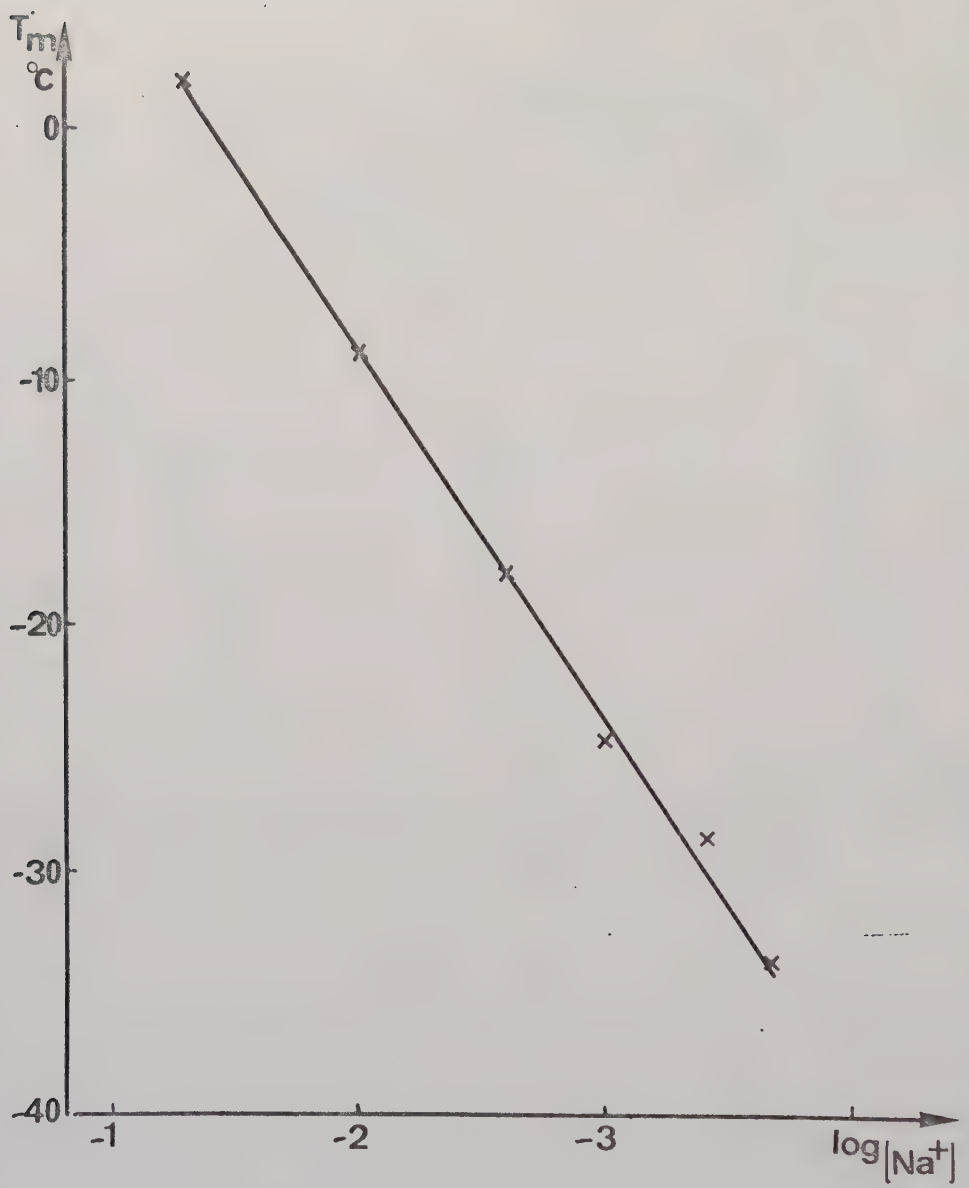


FIGURE 25 : Tm du poly U (A_{260} = 08 à + 20°C) dans 50% de méthanol en fonction de log Na^+ .

et dans certaines préparations il est pratiquement indécelable, ceci est peut être dû à la présence aléatoire d'ions divalents tels que Mg^{++} qui donnent une agrégation plus ou moins importante. De ce fait nous ne le retiendrons pas comme argument pour la discussion de notre phénomène.

2.b. Influence du contenu ionique :

La solution mère est obtenue en dissolvant le poly U dans l'eau seule (1 mg/cc) cependant les ions cristallisés avec le polymère assure à cette solution un certain contenu ionique, à priori inconnu, et qui se retrouve dans la solution diluée.

Lorsque la concentration en Na^+ dépasse 10^{-1} l'addition de 50 % de methanol au poly U semble le dénaturer ou tout au moins supprime la transition. Pour une solution de poly U à 7.10^{-4}M en monomère lorsqu'on diminue le contenu en Na^+ par dilution d'un tampon cacodylate pH 7, on observe une diminution de T_m représentée sur la figure 25. Le T_m suit une loi classique, linéaire en fonction de log $[Na^+]$, cependant pour les faibles valeurs de $[Na^+]$ pour conserver la linéarité on est obligé d'admettre que le contenu apporté par le poly U est de $2,5\ 10^{-3}$M en Na^+ ce qui compte tenu de la précision correspond à peu près à 3 Na^+ par résidu.

2.c. Influence de la concentration en poly U :

Lorsqu'on diminue la concentration du poly U en présence de 50 % de methanol et à très faible force ionique, la transition évolue considérablement (figure 26). Jusqu'à une

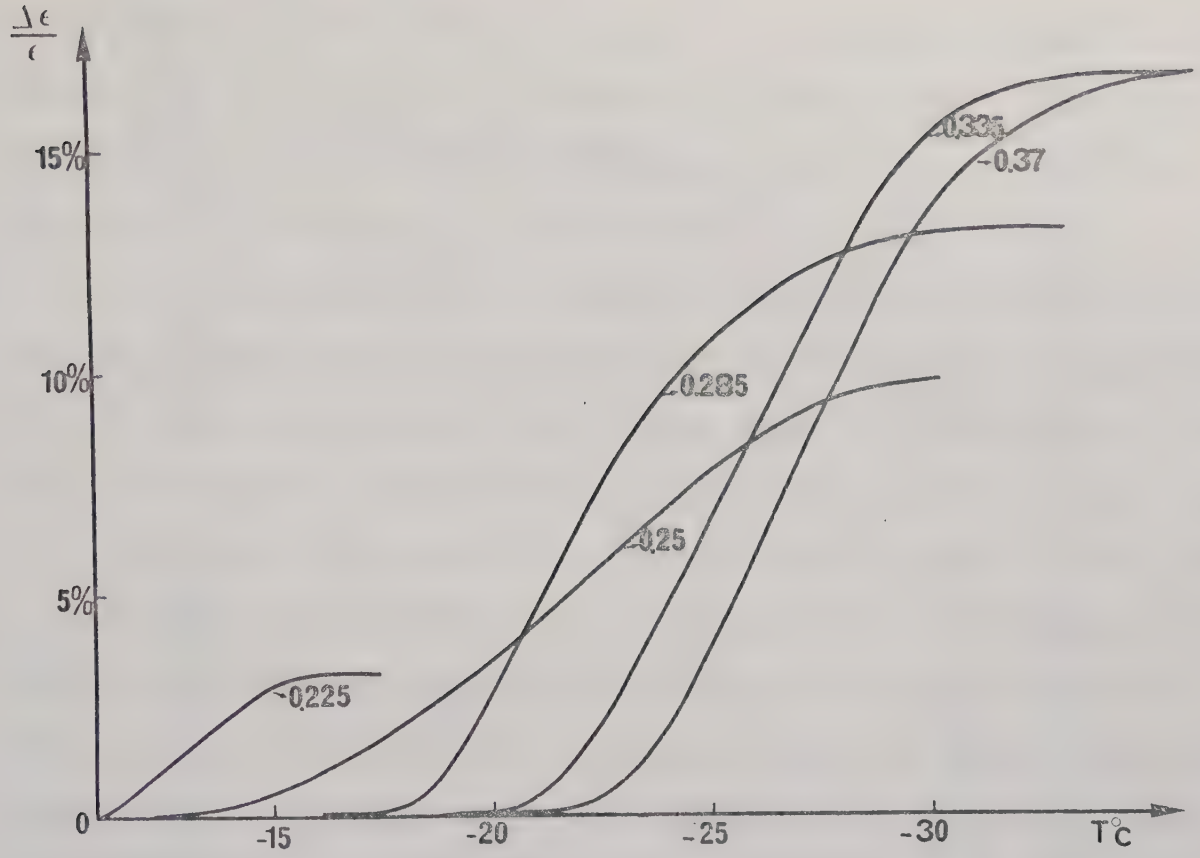


FIGURE 26 : Pourcentage d'hypochromicité à 260nm du poly U, en fonction de la température dans 50% de méthanol (210^{-4} Na^{+}) et pour différentes concentrations : les chiffres indiquent l'absorbance initiale à + 20°C.

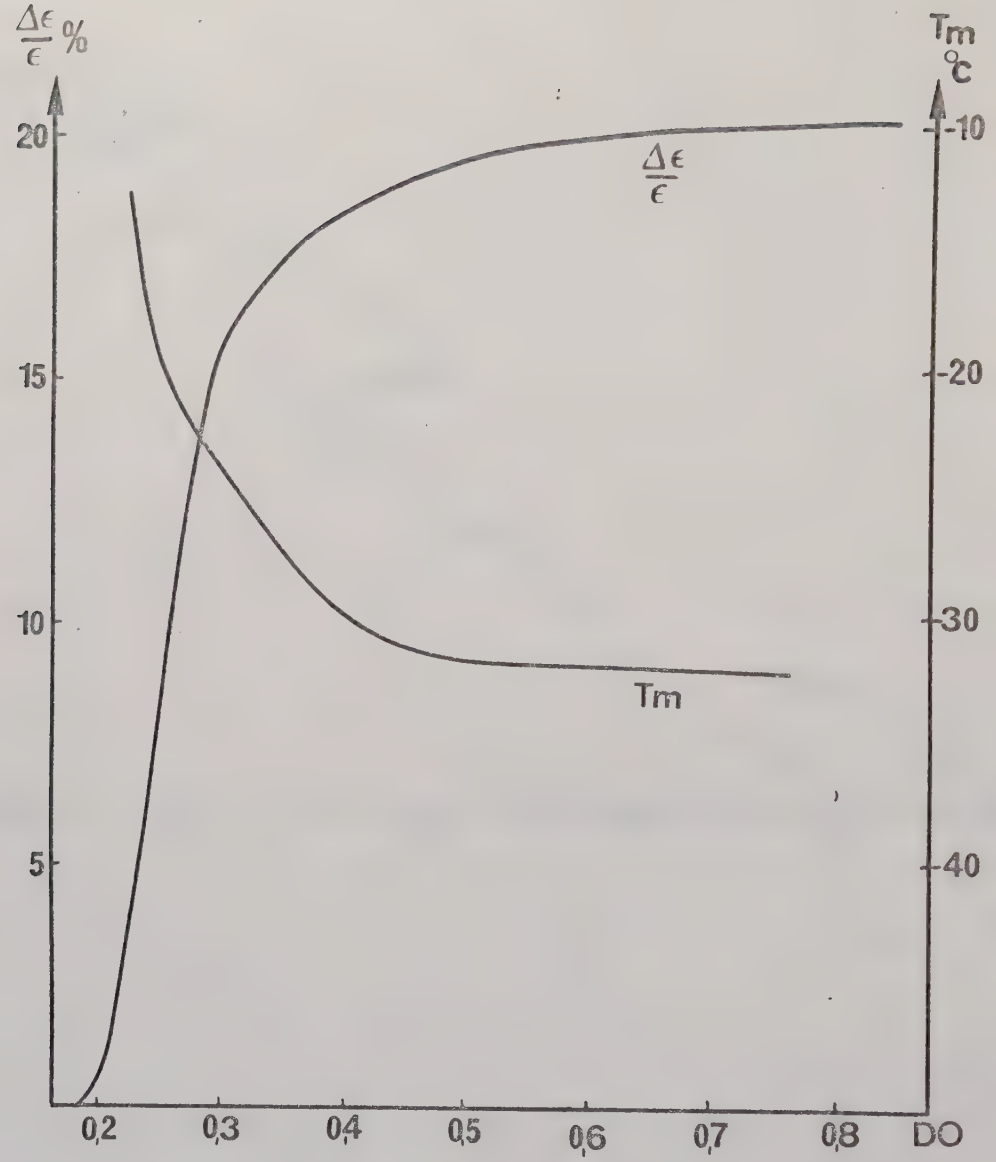


FIGURE 27 : Tm et pourcentage d'hypochromicité accompagnant la structuration du poly U dans 50% de méthanol ($2 10^{-4}$ M Na^+) en fonction de la concentration représentée par la densité optique à 260nm et à +20°C.

concentration correspondant à A_{260} = 0.3 le pourcentage d'hypochromicité ainsi que le T_m varient peu, mais entre 0.3 et 0.2 ces paramètres évoluent brusquement jusqu'à une disparition complète de la transition (figure 27).

Pour expliquer ce phénomène nous sommes obligés d'admettre que l'organisation se produit entre des molécules séparées et non dans une molécule comme l'hypothèse en a été faite (47) (48). L'énergie d'intéraction est fonction de $1/(r_o - r_i)^n$, r_o et n étant des constantes caractéristiques du mode d'interaction, r_i représente la distance moyenne entre deux molécules. Le paramètre r_i augmente lorsque la concentration diminue ainsi que lorsque diminue l'agitation moléculaire avec la température ce qui explique une disparition de l'association par diminution du potentiel. La disparition brusque en fonction de la concentration laisse supposer que l'indice n doit être élevé ce qui est le cas par exemple de liaisons du type Van der Waals fréquemment citées dans le cas de liaisons hydrophobes (30).

L'augmentation du T_m lors de la diminution du phénomène peut s'expliquer par une dispersion des masses molaires de notre échantillon : les premières espèces qui sont frappées par l'interdiction énergétiques sont les moins stables c'est-a-dire correspondant au T_m le plus bas, ce qui explique que le T_m résultant augmente. Ce phénomène s'atténue (alors que $\Delta\varepsilon/\varepsilon$ varie toujours beaucoup) lorsque la force ionique augmente jusqu'à $6{,}5.10^{-3}$M.

Dans le tableau ci-dessous sont résumées quelques données relatives à la disparition de la transition du poly U dans une solution contenant 50 % de methanol :

$[Na^+]$	T_m à forte concentration	Absorbance de disparition
$2.5.10^{-4}$	- 32°C	entre 0,2 et 0,3
$1.25.10^{-3}$	- 20°C	entre 0,1 et 0,3
$5.25.10^{-3}$	- 14°C	entre 0,1 et 0,2
10^{-2}	- 10°C	inférieure à 0,06

Pour un pourcentage donné de methanol, la force ionique impose la valeur du T_m, cependant le facteur principal imposant la disparition semble être la température : pour une certaine T_c la distance moyenne entre molécules interdit l'association. Si $T_m < T_c$ la transition n'a pas lieu ce qui explique que tant que cette condition est remplie la concentration de disparition dépend peu de la force ionique, pour $T_m > T_c$ la transition ne disparaît pas, on peut d'ailleurs grâce au tableau ci-dessus situer T_c entre - 10 et - 14°C, cette plage restreinte s'explique encore par l'exposant n élevé dans l'énergie d'interaction.

Cette dépendance avec la concentration est un phénomène nouveau propre aux basses températures, et permet de tirer des conclusions intéressantes sur la nature des interactions mises en jeu.

3. Etude du poly T .

Le poly T provient de la methylation du poly U en C_5, il possède de ce fait des propriétés voisines avec cependant une plus grande stabilité thermique : son T_m est de + 35°C au lieu de + 4°C pour le poly U en présence de force ionique élevée.

Au-dessus de 60 % de methanol le poly U a tendance à précipiter alors que le poly T supporte jusqu'à 90 % d'alcool.

Lorsque le poly T est mis en solution dans 70 % de methanol avec une force ionique très faible ($< 10^{-3}$) il passe d'une structure désordonnée à une structure ordonnée avec un T_m = - 15°C et un cycle d'hystérèse de quelques degrés de largeur (Fig. 28). Sur la même figure est représentée la transition dans 50 % de methanol, le T_m est alors de - 12°C cependant que le cycle d'hystérèse a disparu.

Le changement de structure disparaît complètement et de la même manière que pour le poly U pour une absorbance comprise entre 0,4 et 0,5 dans 70 % de methanol cependant que pour 50 % elle est encore décelable pour une absorbance inférieure à 0,1. Comme dans le cas du poly U nous trouvons une disparition brusque où la température joue un rôle fondamental avec une température critique située entre - 12 et - 15°C comme pour le poly U ce qui est compatible avec les structures voi-

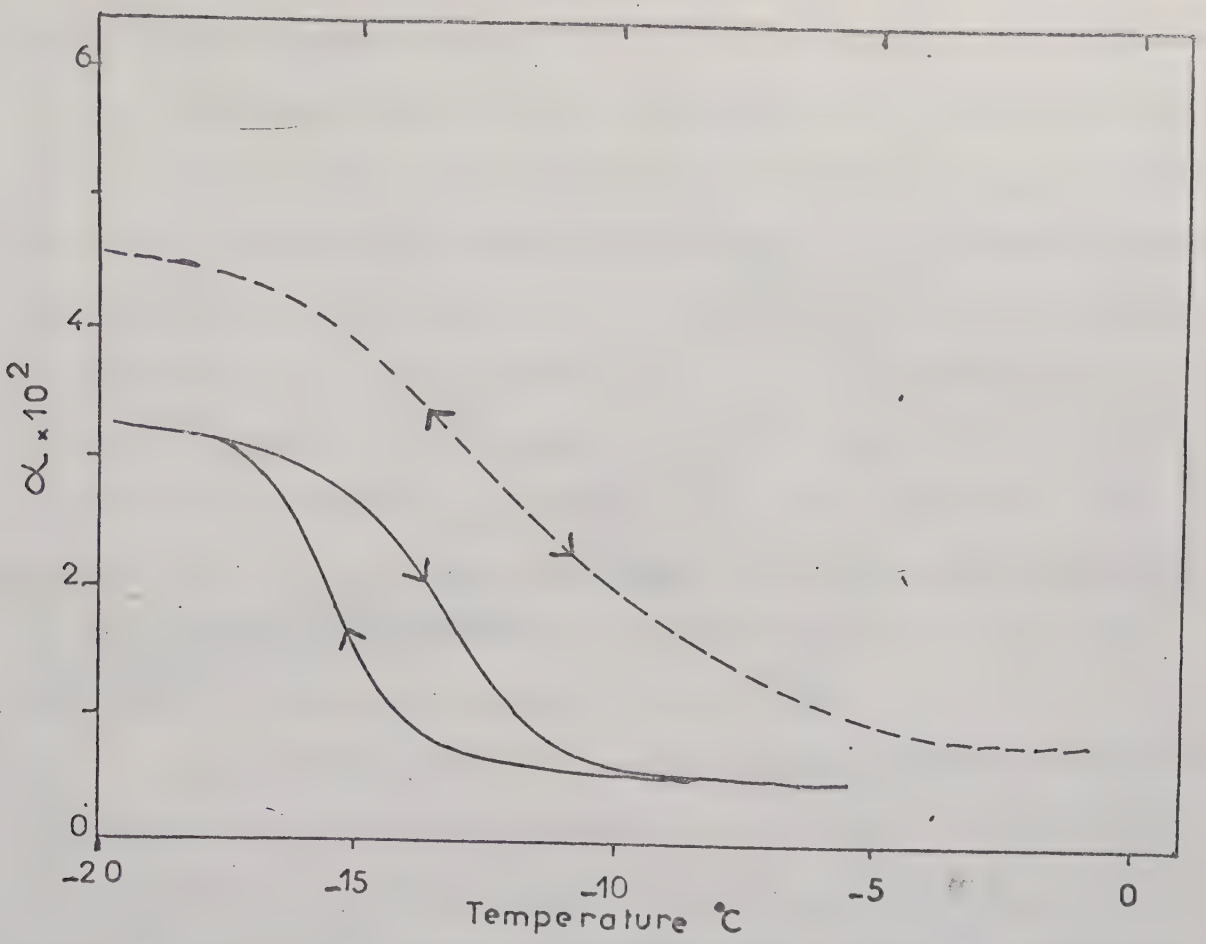


FIGURE 28 : Rotation optique à 289 nm du poly T en fonction de la température dans 50% de méthanol A_{260} = 0.75 (- - - -) et dans 70% de méthanol A_{260} = 1 (———). Les flèches indiquent le sens de variation de la température.

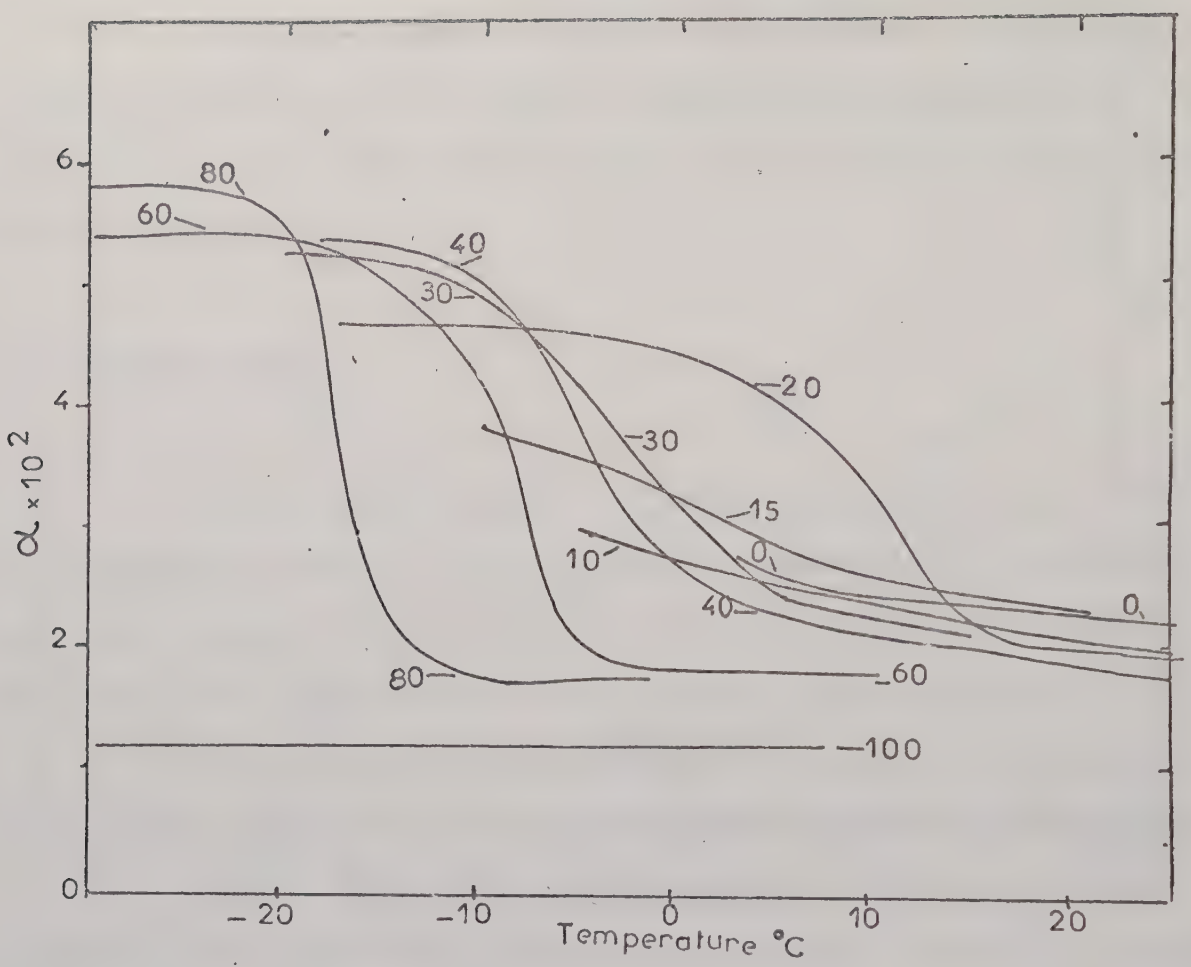


FIGURE 29 : Rotation optique à 289nm du poly T, en fonction de la température, dans différents mélanges méthanol-eau, A_{260} = 1.25. Les nombres indiquent le pourcentage de méthanol en volume.

sines de ces molécules.

Profitant de la bonne tolérance du poly T vis-à-vis du methanol, il est intéressant de faire varier le pourcentage de ce solvant dans de larges proportions. Toujours en présence de très faible force ionique l'effet de quantités croissantes de methanol sur la transition du poly T est représenté sur la figure 29 : pour une concentration inférieure à 20 % on n'observe aucune transition jusqu'au point de congélation, par contre à partir de cette valeur une transition apparaît dont la coopérativité augmente avec le pourcentage en alcool en même temps que le T_m diminue.

L'augmentation de la coopérativité montre le parallèle, déjà cité pour le poly U, entre la croissance du pourcentage en methanol et l'accroissement de force ionique, une différence essentielle demeure cependant cette dernière augmente le T_m alors que le methanol produit l'effet inverse. La variation du T_m en fonction de la proportion de solvant organique est représentée sur la figure 30, on constate un accident dans la courbe située vers 60 % de methanol. Il est difficile d'expliquer ce fait, il est cependant intéressant de noter qu'il se situe dans les conditions pour lesquelles apparaît le phénomène de disparition avec la concentration c'est-à-dire quand le T_m est voisin de la température critique évoquée précédemment.

Lorsque le pourcentage en methanol atteint 100 % la transition disparaît complètement reflétant la destruction complète de la gaine d'hydratation rappelant ainsi le rôle

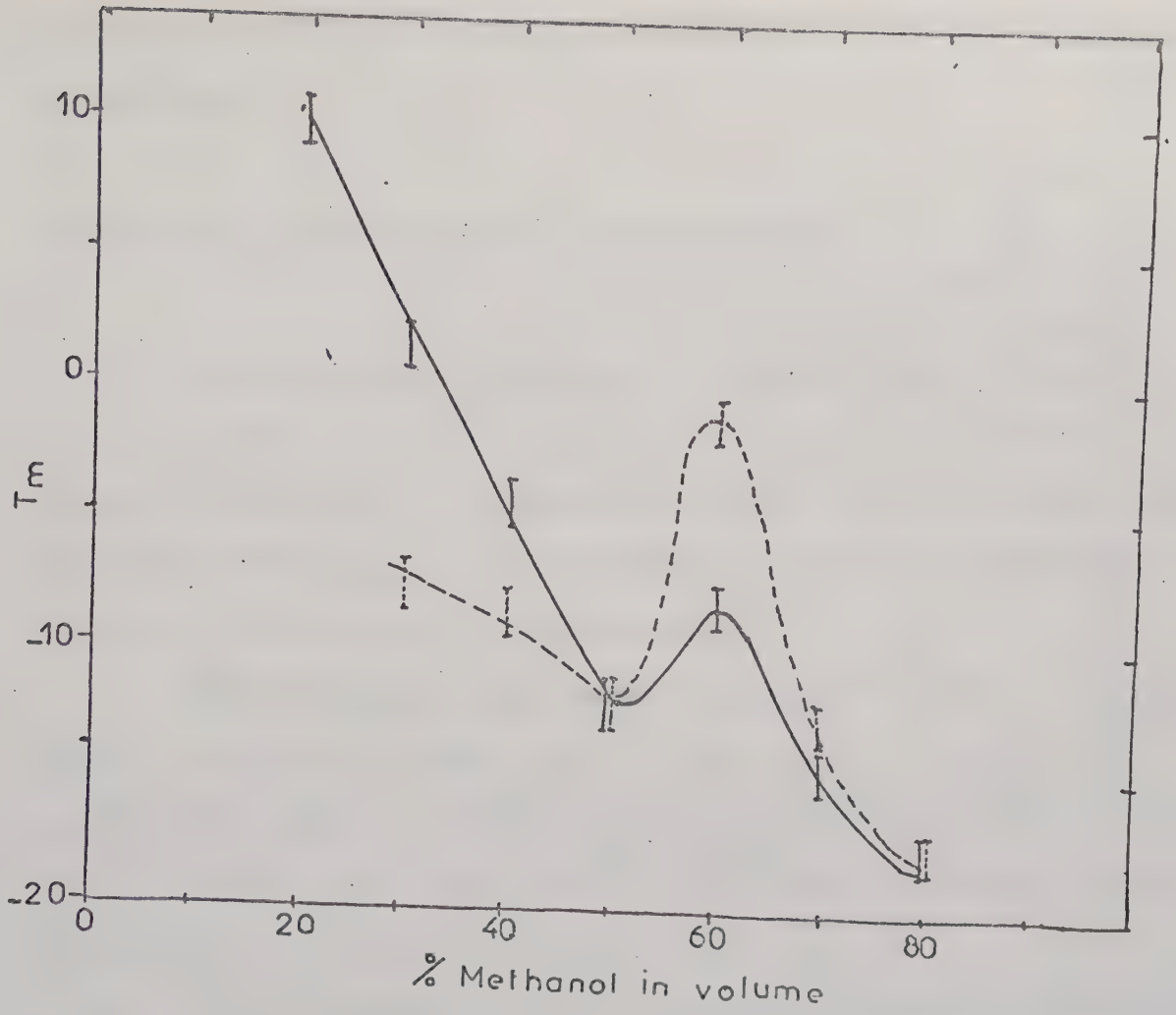


FIGURE 30 : Variation du Tm avec le pourcentage de méthanol du poly T(———) et du mélange poly A.poly T (- - - -).

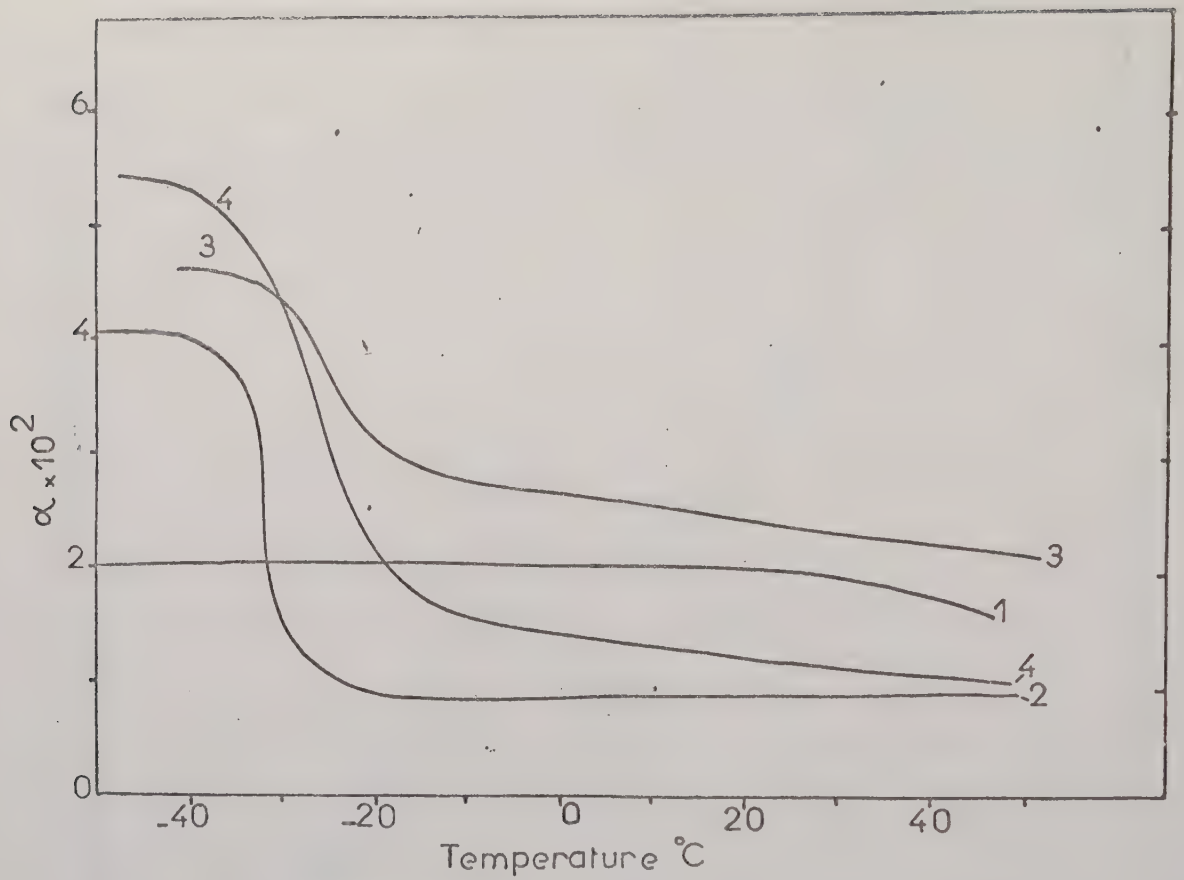


FIGURE 31 : Rotation optique à 282nm, en fonction de la température et dans 50% de méthanol de : 1-poly A (A_{260} = 0.5), 2-poly U (A_{260} 0.5), 3-poly A.poly U (A_{260}= 1), 4-poly A.2 poly U (A_{260} = 1).

particulier joué par l'eau dans l'établissement des structures secondaires.

4. Etude de complexes entre polynucleotides .

Les complexes formés par l'association spontanée de polynucleotides tels que le poly A et poly U présentent un intérêt considérable comme modèles simples des structures hélicoïdales ordonnées des acides nucleiques et à ce titre ont fait l'objet de nombreuses études (49)(50)(51).

Nous sommes en présence d'équilibre entre les différentes formes structurées poly U, poly A, poly A, poly U à double brin, poly A. 2 poly U à triple brin, équilibres déplacés en fonction des concentrations en poly A et poly U, de la température, de la force ionique et du pH.

Il ne s'agit pas ici de reprendre une étude systématique des paramètres ci-dessus dans nos conditions, mais seulement de voir dans quelle mesure à basse température et en présence de methanol sont modifiées les interactions entre les différents polynucleotides.

4.a. Complexes entre poly_A_et poly_U_:

Sur la figure 31 est représentée la variation de la rotation de solutions de poly A, de poly U, puis de poly A. poly U et enfin de poly A. 2 poly U en solution dans 50 % de methanol et en présence de très faible force ionique.

En solution aqueuse saline la différence de T_m entre poly U seul et poly A. poly U est de l'ordre de 75°C alors que dans nos conditions elle est réduite à moins de 10°C. Ceci peut signifier que en présence de methanol et sans sel les interactions A.U. deviennent d'une intensité comparable à celles de U.U. alors que dans les conditions usuelles elles sont beaucoup plus fortes.

Pour poly A. poly U la concentration de disparition du phénomène correspond à une absorbance à 260 nm de 0,9 alors que pour poly A. 2 poly U elle se situe vers 0,7 ceci correspond dans les deux cas à peu près à la concentration critique en poly U trouvée lorsqu'il était seul.

4.b. Complexes entre poly A et poly T :

Nous avons étudié comparativement le poly T seul et le mélange équimolaire poly A. poly T en fonction du pourcentage en methanol, les T_m correspondants sont représentés sur la figure 30.

Pour un pourcentage en methanol inférieur à 50 % on observe que T_m (poly A. poly T) $<$ T_m (poly T) ceci est à priori surprenant et supposerait que le poly T sous forme désordonnée subit de la part du poly A, lui-même déjà ordonné, des interactions qui sans établir une structure bien organisée empêcherait néanmoins la formation en hélice du poly T.

Pour 60 % de methanol on trouve un T_m supérieur pour le poly A + poly T ce qui laisse supposer la formation du complexe poly A; poly T.

Pour 70 % de methanol, à basse température, le spectre expérimental obtenu pour le complexe poly A. poly T coincide bien avec celui obtenu en additionnant ceux de poly A seul et de poly T seul obtenus dans les mêmes conditions (fig. 32). Ceci peut s'interpréter soit comme un comportement individuel des deux polynucleotides, soit comme une coincidence fortuite des pourcentages d'hélicité dans les deux cas. L'égalité de T_m entre le poly T et celle du mélange poly T + poly A font pencher en faveur de la première hypothèse.

5. Comportement des co-polymères alternés .

Comme dernier exemple nous avons étudié dans nos conditions les propriétés des polyribonucleotides alternés AU et AT.

Ces polymères possèdent des séquences complémentaires et sont susceptibles de se replier pour former une structure organisée antiparallèle comme il a été montré par microscopie électronique (52).

Dans le cas du poly AU dans 50 % de methanol nous trouvons un T_m de + 31°C contre + 45°C pour le même en solution aqueuse $\left([Na^+] = 10^{-2}\right)$(53) cependant avec ce produit nous avons rencontré des phénomènes fréquents d'agrégation conduisant à

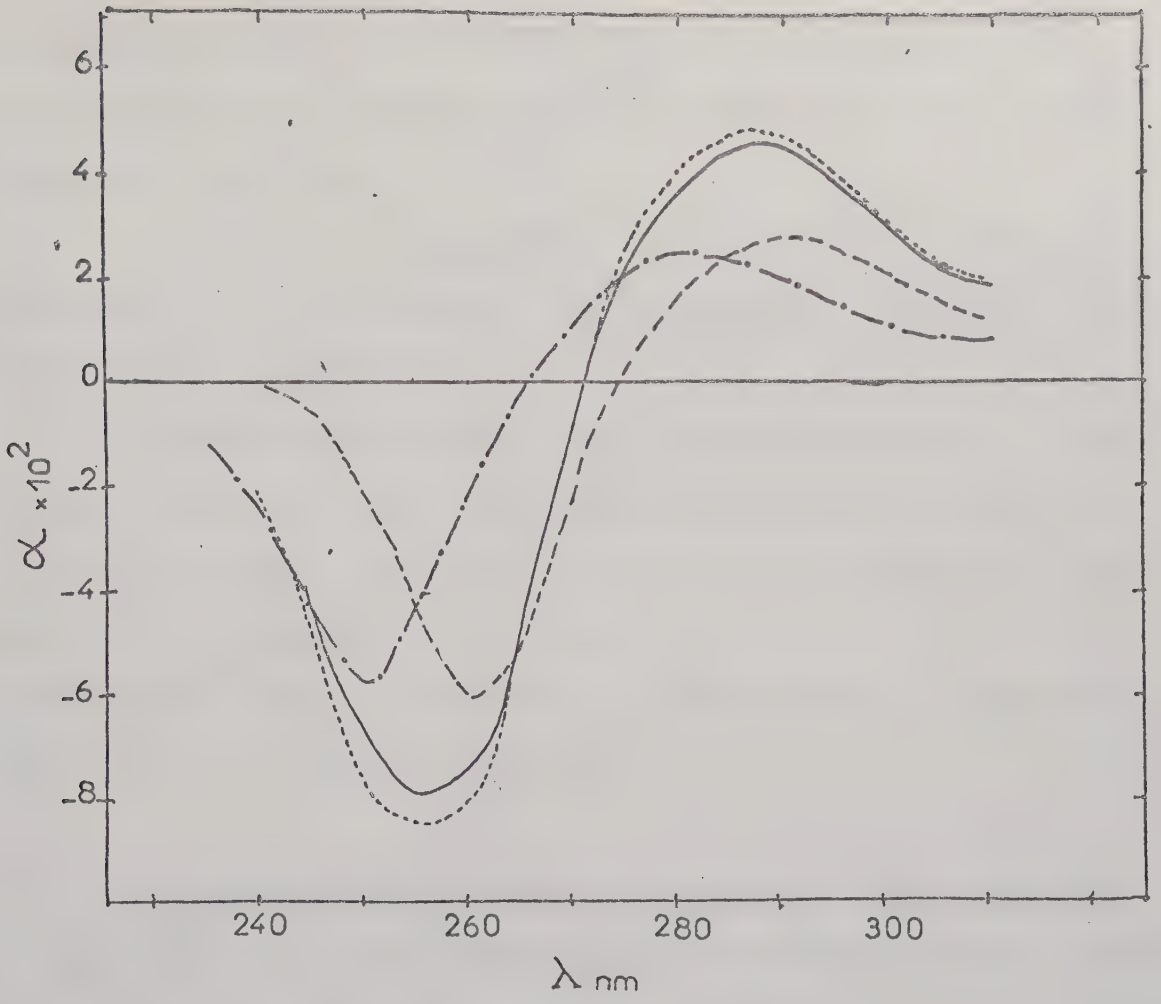


FIGURE 32 : Courbes de dispersion rotatoire dans 70% de méthanol et à -30°C : poly A (A_{260} = 0.5)(-.-.-), poly T (A_{260} = 0.5) (- - -) de la somme des deux courbes précédentes (.....) et du mélange poly A. poly T (A_{260} = 1) (————).

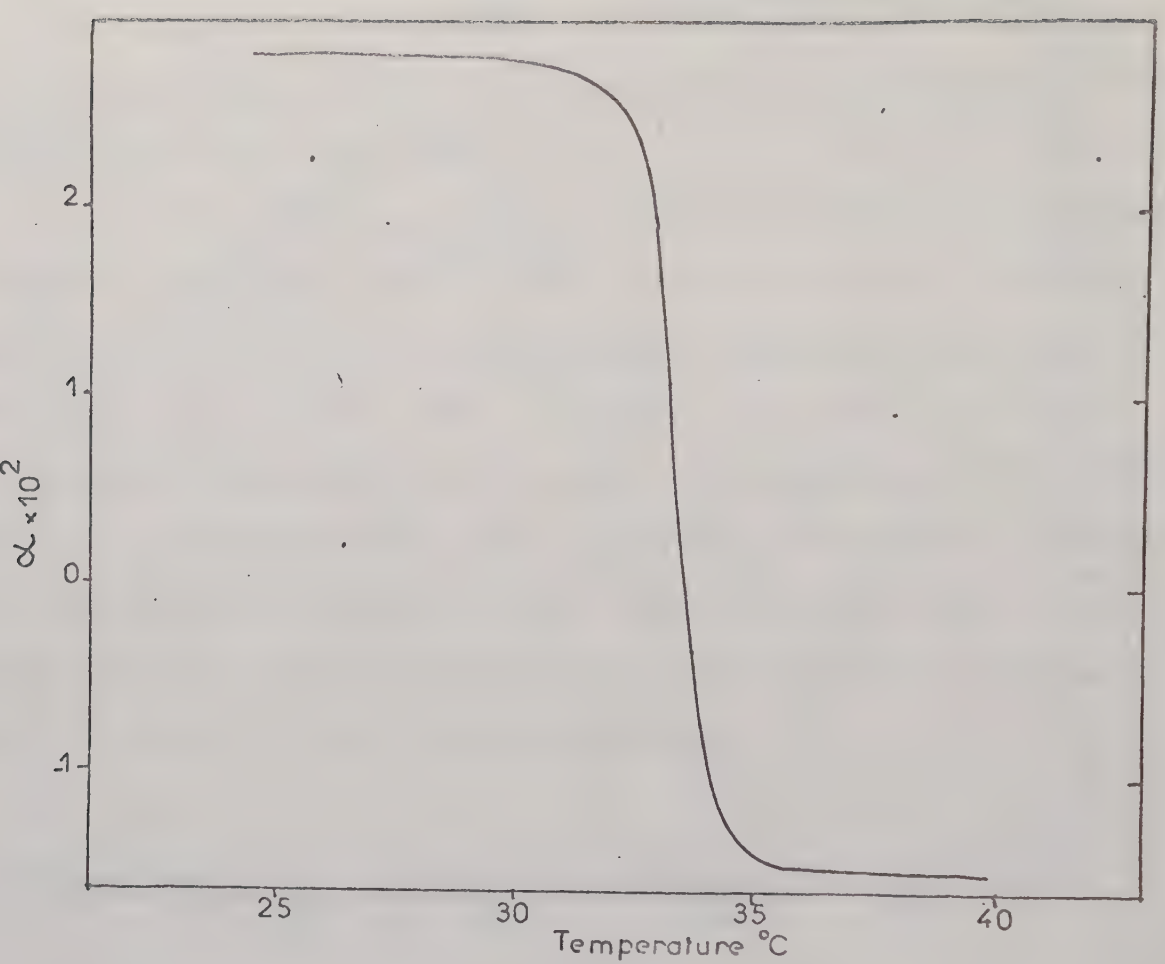


FIGURE 33 : Pouvoir rotatoire à 263nm en fonction de la température du poly AT dans 50% de méthanol (A_{260} = 0.5).

une précipitation, cet inconvénient dû probablement à des traces de métaux divalents est palié par l'addition d'EDTA complexant bien connu.

Le poly AT ne présente pas ces inconvénients et montre dans 50 % de methanol une transition bien coopérative avec un T_m de 33,5°C (Fig. 33).

En solution aqueuse pour une force ionique $Na^+ = 10^{-2}$, le T_m du complexe entre brins séparés poly A. poly U est de 35°C et pour poly AU de 45°C, dans nos conditions le second passe à + 31°C alors que le premier est rejeté vers les basses températures. Cette différence de comportement va bien dans le sens de deux stuctures différentes :

1) en épingle à cheveu et anti-parallèle pour les polymères alternés structure faiblement influencée par l'addition de quantités importantes de methanol.

2) structure à plusieurs brins probablement parallèles dont le domaine d'existence est rejeté vers les basses températures par la présence du methanol, c'est le cas de poly U, du poly T et de leurs complexes avec le poly A.

-=-=-=-=-=-=-

CHAPITRE 4

LES ACIDES NUCLEIQUES

Comme suite logique à l'étude des polynucleotides, nous avons abordé celle du comportement structural, d'acides nucleiques en présence de méthanol et à basse température. Nous avons étudié principalement l'acide déxoxyribonucleique (ADN) et à titre de comparaison d'un acide ribonucleique de transfert (tARN).

Les ADN de différentes provenances, l'ADN méthylé ou lié à des hydrocarbures ont été préparés dans le laboratoire de A.M. MICHELSON. Les fractions purifiées du tARN Val utilisé sont des dons du Dr. B. CLARKE.

Les méthodes d'étude de la structure des acides nucléiques sont variées, cependant ici encore nous ne disposons que de deux techniques adaptées à basse température, la spectrophotométrie et la spectropolarimétrie, c'est cette dernière qui nous fournira l'essentiel des résultats de ce chapitre.

HERSKOVITS et GEIDUSCHEK (54) (55) ont étudié de manière précise et très complète le comportement de l'ADN en présence de méthanol pour des températures supérieures à 0°C. Ils ont mis en évidence, des phénomènes de dénaturation plus ou moins reversible ou d'agrégation, dépendant du pourcentage de solvant organique et de la valeur de la force ionique. Cependant à pH 7, et pour une concentration saline voisine de 10^{-3}M jusqu'à 70 % de méthanol l'ADN semble natif à température ordinaire. Ce sont ces critères que nous avons choisis. Partant de ces conditions nous

avons étudié le comportement de l'ADN résultant de l'abaissement de la température bien au-dessous de 0°C, ainsi qu'à titre de comparaison celui du tARN et de complexes de l'ADN.

I - RESULTATS -

1. l'A.D.N. à température ordinaire .

En présence de Na^+ ($5\ 10^{-3}$M), en augmentant le pourcentage en méthanol jusqu'à 70 %, le spectre d'absorption ne varie que de 1 % par rapport à celui obtenu dans un tampon aqueux (après évidemment la correction nécessitée par la contraction du mélange hydro-alcoolique).

La température de demi-dénaturation (Tm) est abaissée par l'augmentation du pourcentage en méthanol et par exemple pour l'ADN de MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS il y a une diminution du Tm de 30°C pour 70 % de méthanol par rapport au tampon aqueux. Il est important de noter que bien que l'apport de méthanol diminue la stabilité thermique de l'ADN, l'hyperchromicité accompagnant la dénaturation reste identique à celle observée en solution purement aqueuse, cependant que la coopérativité du phénomène est conservée.

La modification de la courbe de dispersion rotatoire de l'ADN en fonction de pourcentages croissants de méthanol est indiquée sur la figure 34; on constate que 70 % d'alcool entraîne une diminution de 50 % de la magnitude du premier pic positif.

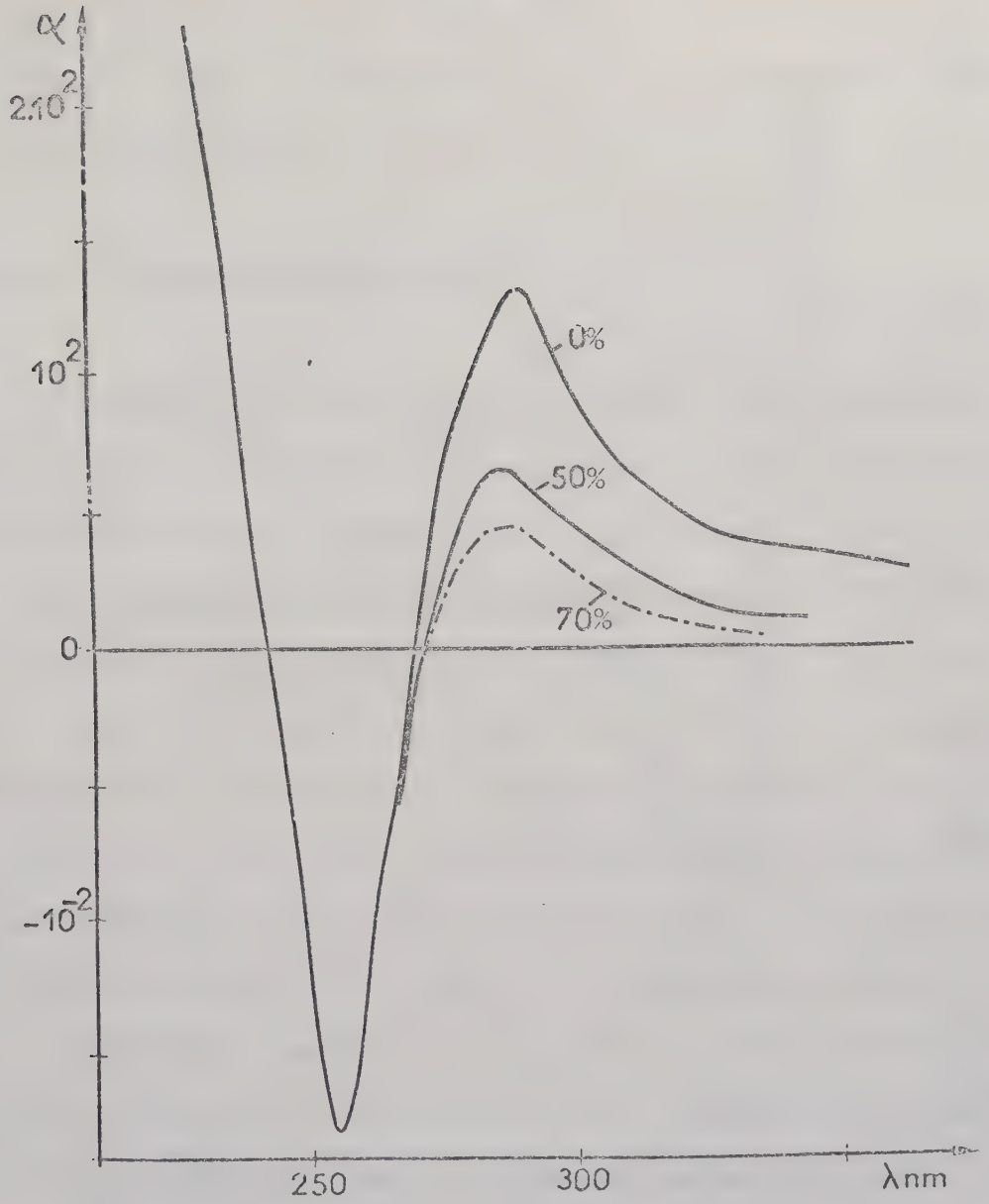


FIGURE 34 : Spectres de dispersion rotatoire de l'ADN de Micrococcus Lysodeikticus (A_{260} = 1.5) dans des mélanges méthanol-eau 510^{-3}M Na^{+}. Les nombres indiquent le pourcentage de méthanol en volume, T= +20°C.

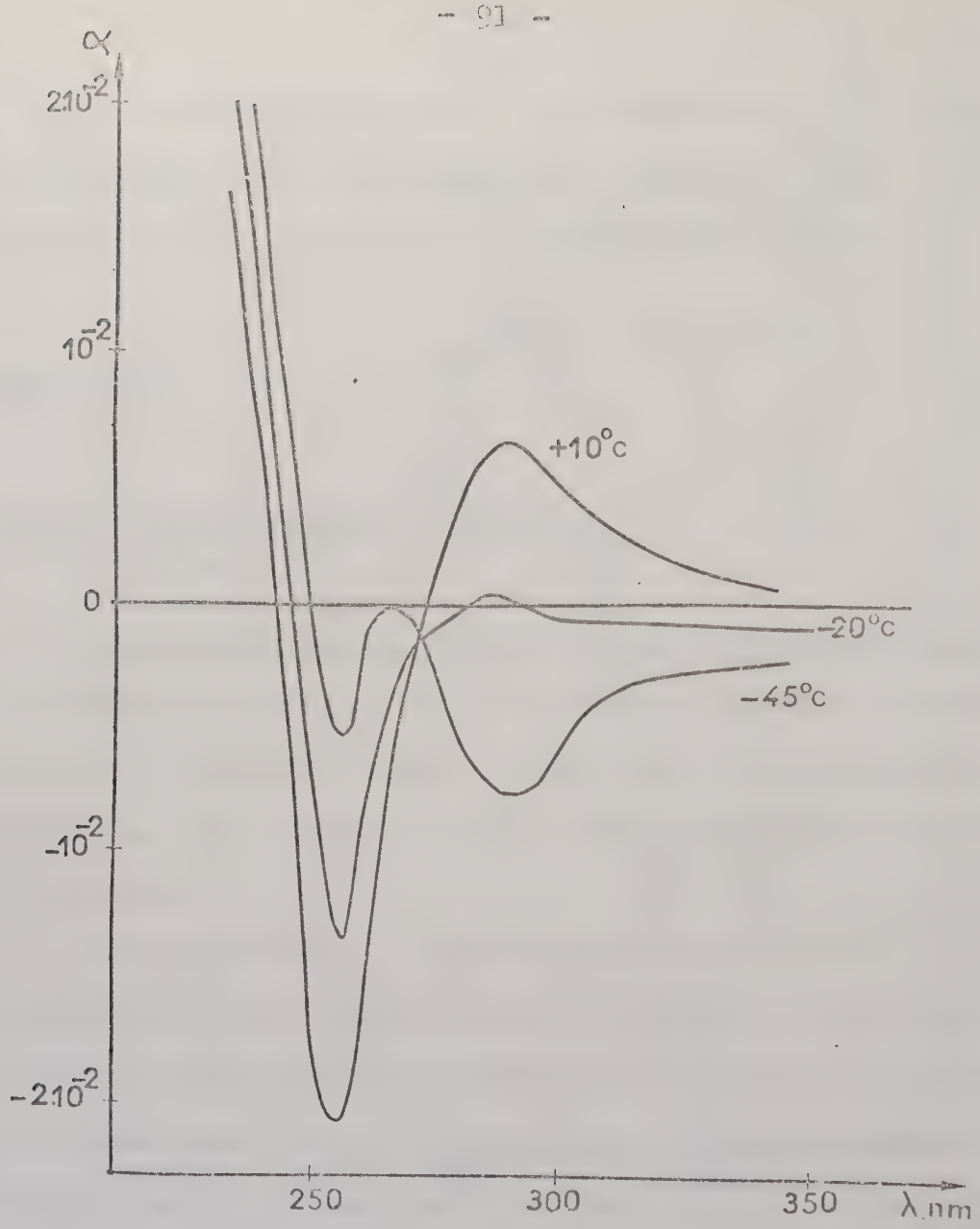


FIGURE 35 : Spectres de dispersion rotatoire de l'ADN de Micrococc
Lysodeikticus (A_{260} = 1.5) dans 50% de méthanol (510^{-3}M Na^{+}) pour
différentes températures.

Par contre le tARN a une courbe de D.R.O. invariable avec le pourcentage en methanol.

2. l'A.D.N. à basse température .

Lorsqu'on abaisse la température d'une solution hydro-alcoolique d'ADN, on observe une faible hyperchromicité. Par exemple, elle est inférieure à 2 % entre + 20°C et - 90°C pour l'ADN de MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS dans 70 % de methanol. Une telle variation est également observée avec le tARN.

On observe dans les mêmes conditions un important changement dans la courbe de dispersion rotatoire, visible sur les figures 35 et 36 pour l'ADN de MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS dans respectivement 50 % et 70 % de methanol. La bande positive dont le maximum est à 290 nm se transforme progressivement en une bande négative centrée sur 293 nm et cette inversion est parfaitement reversible. Parallèlement la bande négative à 255 nm devient positive, on peut donc dire qu'il y a inversion complète du premier effet Cotton de l'ADN : l'ensemble de ce phénomène est bien représenté sur la figure 37 où l'on constate que le second effet Cotton situé à 220 nm est peu affecté par la température. La transformation se fait avec un point de rotation constante à 273 nm.

La rotation α en fonction de la température et pour différentes longueurs d'onde est représentée sur la figure 38. On enregistre un palier vers - 80°C dans 70 % de methanol, cependant que dans 50 % d'alcool et bien que le phénomène démarre de manière identique, la transition est interrompue

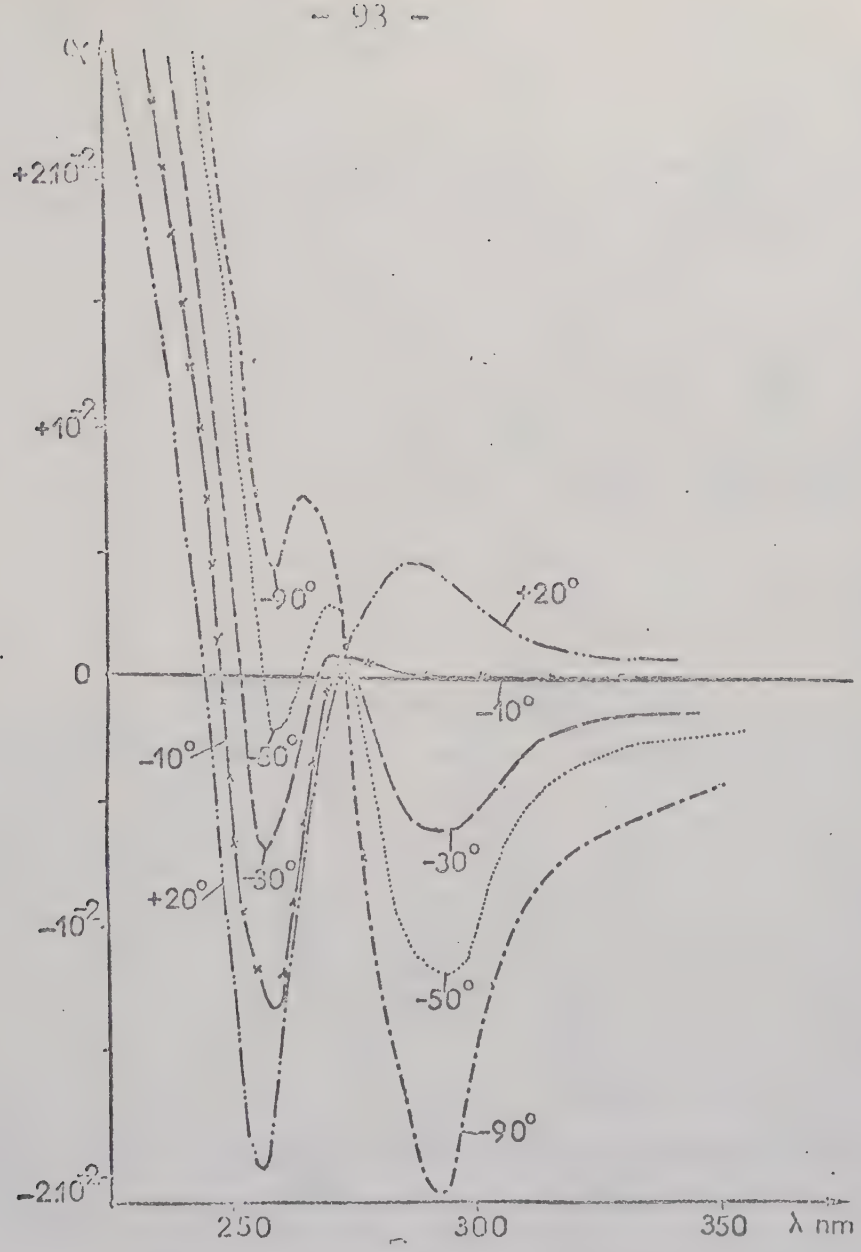


FIGURE 36 : Spectres de dispersion rotatoire de l'ADN de Micrococcus Lysodeikticus (A_{260} = 1.5) dans 70% de méthanol 510^{-3}M Na^{+} pour différentes températures.

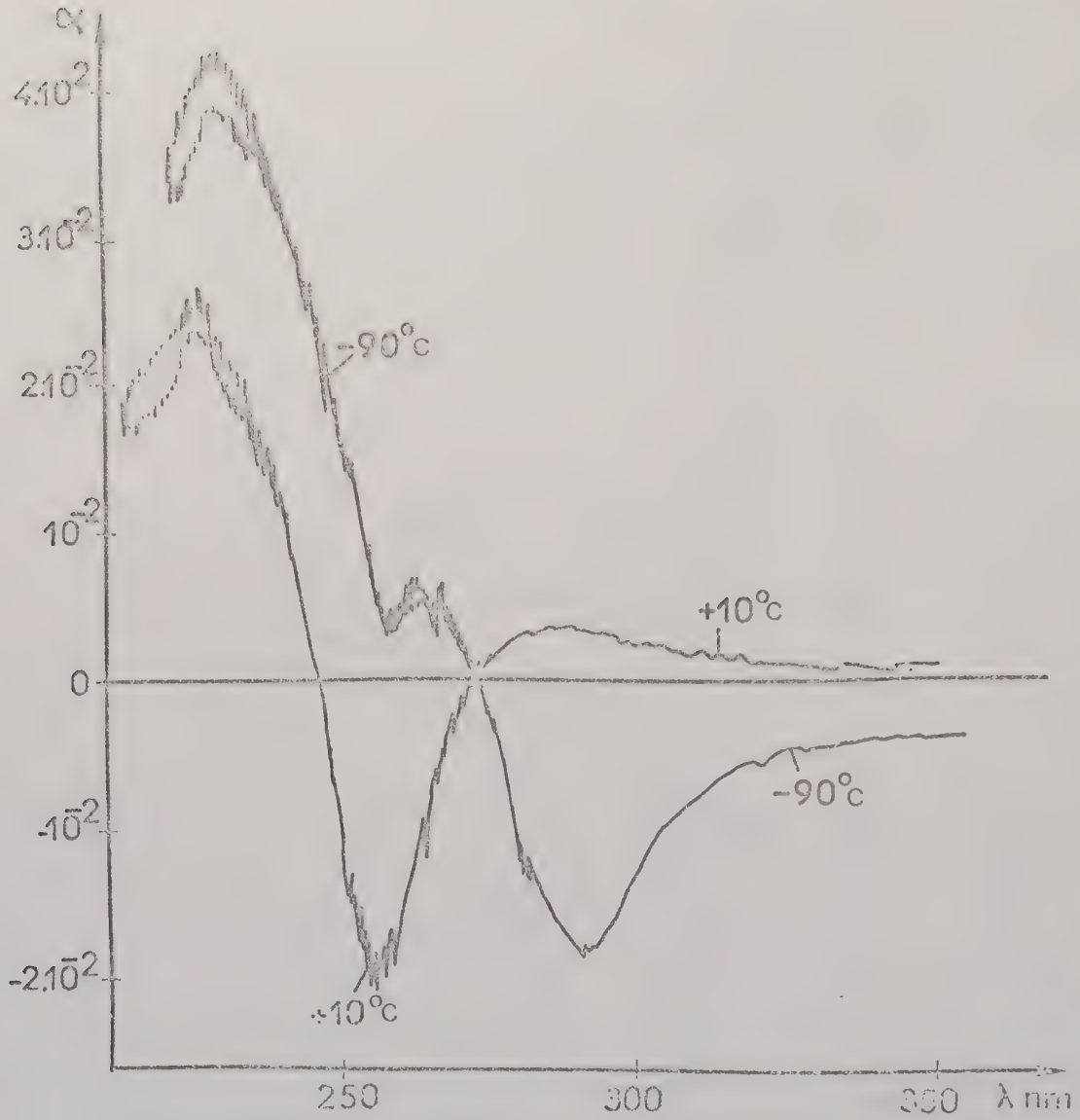


FIGURE 27 : Spectres de dispersion rotatoire de l'ADN de Micrococc Lysodeikticus (A_{260} = 1.5) dans 70% de méthanol (510^{-3}M Na^{+}) pour différentes températures.

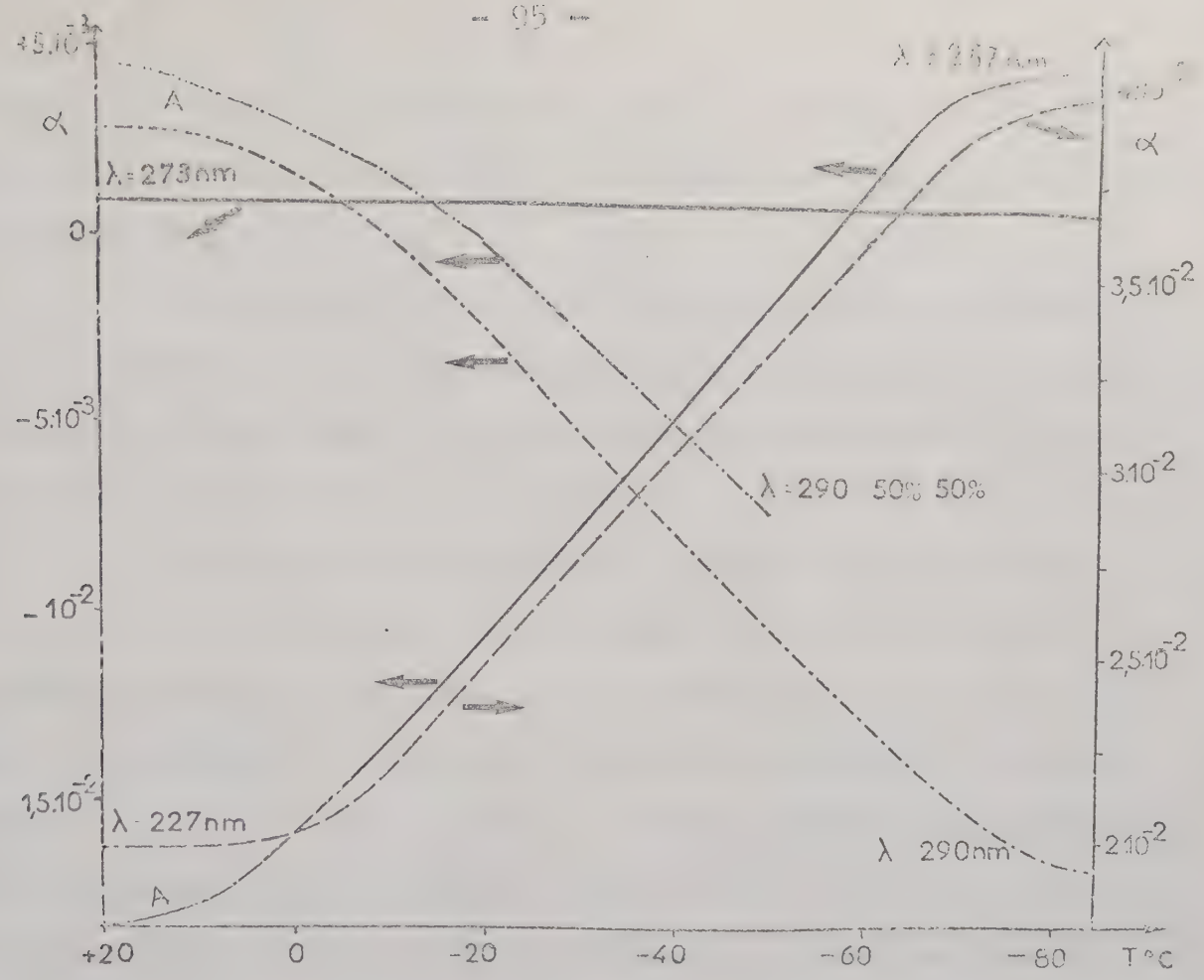


FIGURE 38 : Pouvoir rotatoire, à différentes longueurs d'onde, en fonction de la température pour l'ADN de Micrococcus Lysodeikticus (A_{260} = 1.5) dans 70% de méthanol (———, - - - -, -.-.-,) et dans 50% de méthanol (-..-..).

vers - 50°C par la congélation. Pour λ = 273 nm on trouve bien une rotation constante en enregistrant α en fonction de la température.

D'autre part le profil de ces courbes est indépendant de la vitesse de refroidissement pourvu qu'elle reste inférieure à 1°C/mn. Lors de la remontée en température, aucun phénomène d'hystérèse n'est observé.

Des résultats identiques ont été obtenus avec les A.D.N. de C. perfringens ou de thymus de veau. Par contre aucun phénomène de ce type n'est observé avec le t.A.R.N. ou avec les formes structurées de polyribonucleotides tels que poly U, poly A, poly T, poly AU. On ne l'observe pas non plus avec les complexes en double hélice poly G. poly C et poly dG. poly dC. Nous sommes donc en présence d'un phénomène bien spécifique de l'A.D.N. mais indépendant de la provenance de celui-ci.

3. Etude de complexes de l'A.D.N.

Il est possible de fixer ou simplement d'intercaler un certain nombre de substances sur la molécule d'A.D.N., ce qui a pour résultat comme on sait de perturber sa fonction biologique.

Il nous a semblé intéressant de voir comment se comportent quelques uns de ces complexes, après avoir préalablement vérifié que ces derniers supportent l'addition du methanol utilisé comme antigel.

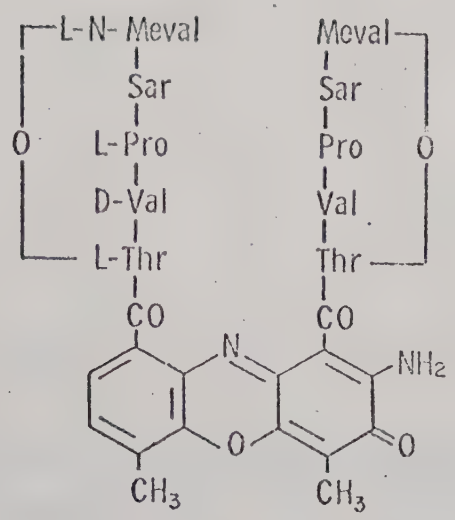
3.a. Etude du complexe A.D.N - actinomycine :

L'actinomycine C (appelée également actinomycine D) dont la formule est représentée sur la figure 39 est susceptible de se lier au D.N.A. inhibant ainsi la synthèse d'acides nucleiques (56). Il a été montré (57) qu'elle se fixait par liaison hydrogène aux résidus du type guanine (figure 39) le groupement NH_2 jouant un rôle fondamental dans cette fixation. La molécule d'actinomycine se loge dans le petit sillon de l'ADN (58), les parties peptidiques se trouvant à l'extérieur de la structure. La stabilité thermique de l'ensemble est supérieure à celle de l'ADN seul.

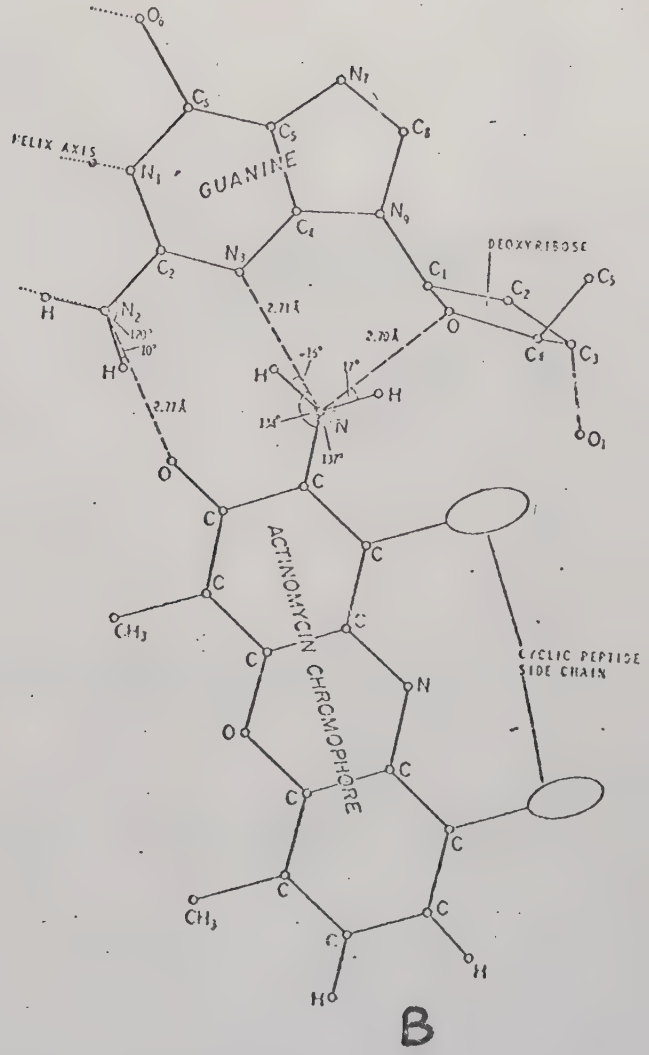
Le complexe est préparé dans le tampon cacodylate pH 7, les concentrations utilisées sont $6\ 10^{-6}$ en actinomycine et $1,7\ 10^{-4}$M en ADN (en mononucleotide). Après 24 h d'incubation on ajoute 50 % de methanol.

La formation du complexe change le spectre, appartenant au domaine visible, de l'actinomycine. Le spectre différentiel (complexe contre actinomycine) est représenté sur la figure 40, il est conforme à celui publié antérieurement (58). Lorsqu'on ajoute 50 % de methanol le spectre est un peu modifié (figure 40) mais on se rend compte que le complexe subsiste.

La courbe de dispersion rotatoire du complexe est représentée sur la figure 41 : il s'agit évidemment de la superposition des effets Cotton de l'ADN et de l'actinomycine mais la bande positive à 290 nm de l'acide nucleique est bien visible.



A



B

FIGURE 39 : A - Structure de l'actinomycine C_1 appelée également actinomycine D.

B - Modèle proposé par REICH et coll. (57) pour la liaison de l'actinomycine à la guanosine de l'ADN possèdant la conformation B.

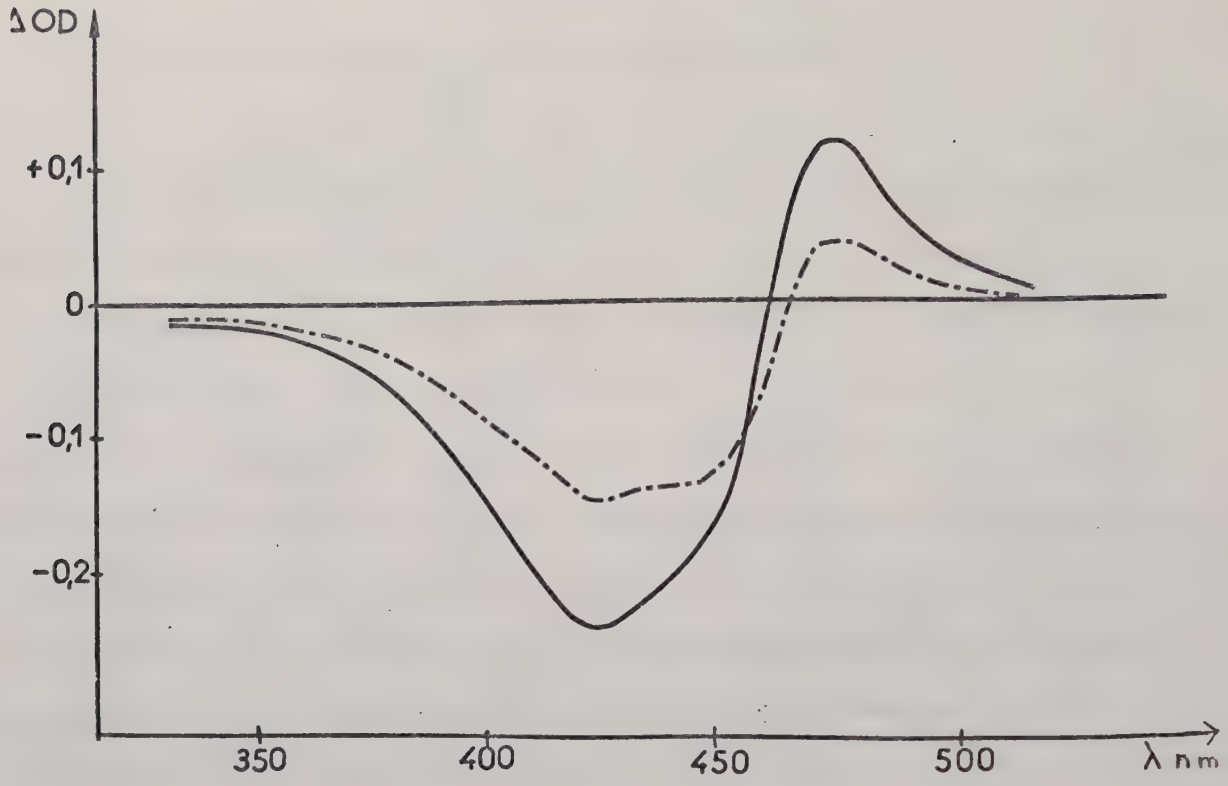


FIGURE 40 : Spectres différentiels du complexe entre l'actinomycin D (610^{-6}M) et l'ADN (A_{260} = 1.4) par rapport à l'actinomycine seul en solution aqueuse (———) puis dans 50% de méthanol (–·–·–·)

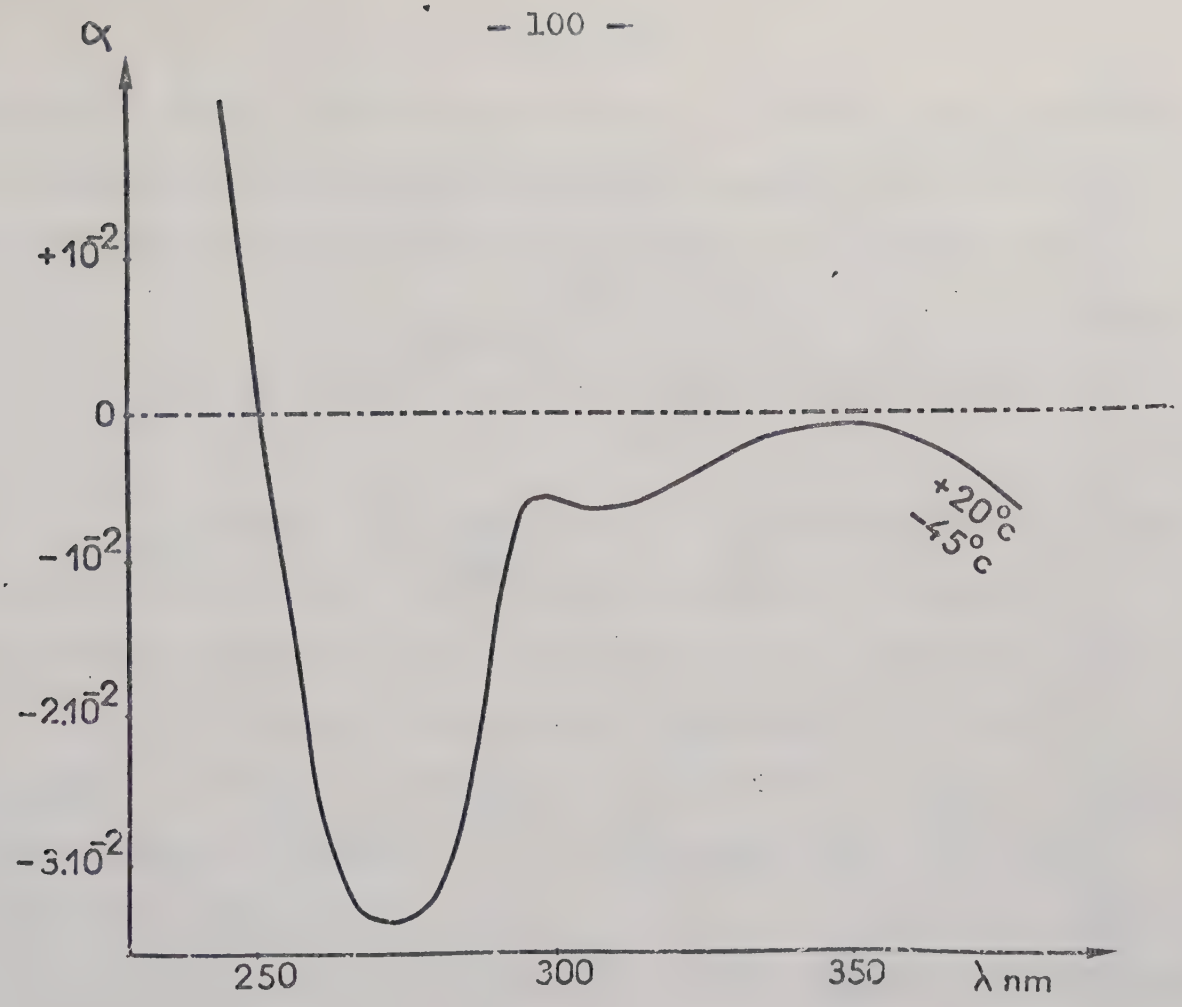


FIGURE 41 : Spectre de dispersion rotatoire du complexe actinomycine ADN dans 50% de méthanol. Conditions identiques à celles de la figure 40.

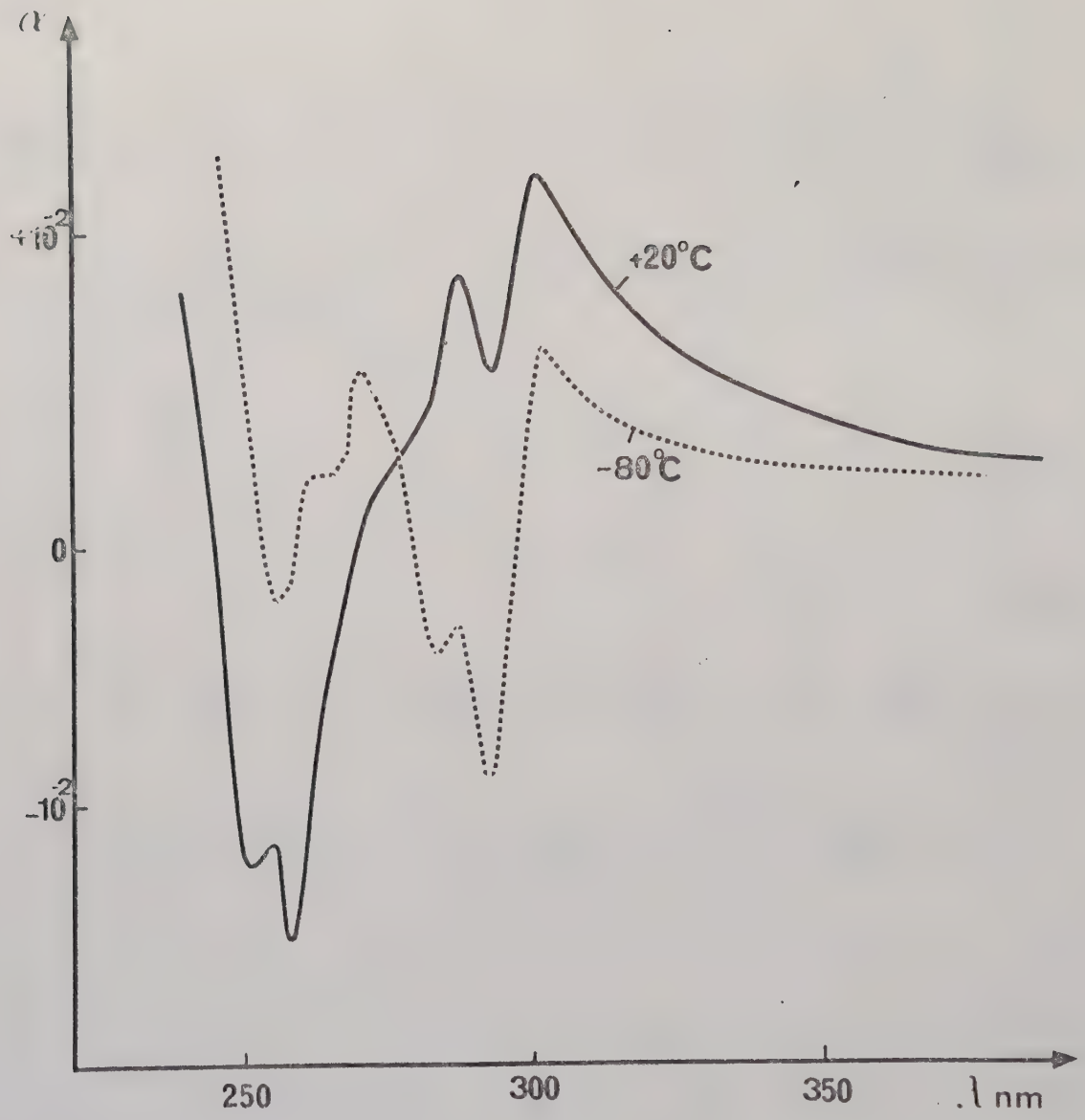


FIGURE 42 : Spectres de dispersion rotatoire, pour différentes températures, du complexe méthylbenzanthracène.-ADN. Le pourcentage d'hydrocarbure est ici de 12% par rapport aux mononucléotides.

Cette courbe ne montre aucune variation entre + 20°C et - 45°C: le complexe ADN-actinomycine ne subit pas en fonction de la température la transition observée avec l'acide nucleique.

3.b. Etude du complexe A.D.N. methyl benzanthracène :

Le methyl benzanthracène est un hydrocarbure qui par son groupement methyl peut se lier de manière covalente à l'atome de carbone C_8 des résidus guanine de l'ADN (59).

Ce corps se loge dans le grand sillon de l'ADN et augmente sa stabilité thermique. Il peut être l'objet de réactions photochimiques dont les conséquences sur la molécule d'ADN sont importantes (59).

La courbe de dispersion rotatoire observée est complexe et résulte de la superposition des effets Cotton dus à l'ADN et de ceux dus à l'hydrocarbure (Fig. 42). Lorsqu'on abaisse la température en présence de methanol, on retrouve l'inversion de l'effet Cotton propre à l'ADN (Fig. 42), cet échantillon correspondant à une fixation de 12 % d'hydrocarbure par rapport aux nucleotides.

3.c. Etude de l'ADN methylé :

Par action de la tri-n-butylamine et du dimethyl sulfate il est possible de methyler l'ADN. La fixation se fait en N_7 de la guanine jusqu'à une proportion de 80 % .

Cette substitution diminue la stabilité thermique de l'ADN dont le T_m passe de 70° à 55,5°C (pH 7, 0,015 M Na^+)(60). En présence de methanol le T_m est abaissé mais l'écart avec la solution aqueuse demeure sensiblement le même que pour l'ADN.

L'effet Cotton de l'ADN methylé est sensiblement différent de celui de l'ALN seul (figure 43) le maximum est situé à 300 nm au lieu de 290 nm.

Lorsque la température diminue, on n'observe pas d'inversion de l'effet Cotton mais simplement une modification : la courbe de dispersion rotatoire de l'ADN-CH_3 devient à - 80°C identique à celle de l'ADN seul en solution aqueuse.

II - DISCUSSION -

1. Existence d'une nouvelle structure à basse température .

Dans 70 % de methanol (5 10^{-3}M Na^+) à température ordinaire, l'ADN conserve la structure qu'il présente en solution aqueuse, dénommée classiquement forme B, avec cependant un faible changement comme le montre l'étude du pouvoir rotatoire, et qui confirme des résultats antérieurs (55).

Dans ces mêmes conditions en abaissant la température jusque vers - 80°C, la courbe d'absorption varie très peu, indiquant que la structure en double hélice subsiste dans son ensemble, cependant que la modification importante de l'effet Cotton laisse supposer l'apparition d'une structure différente

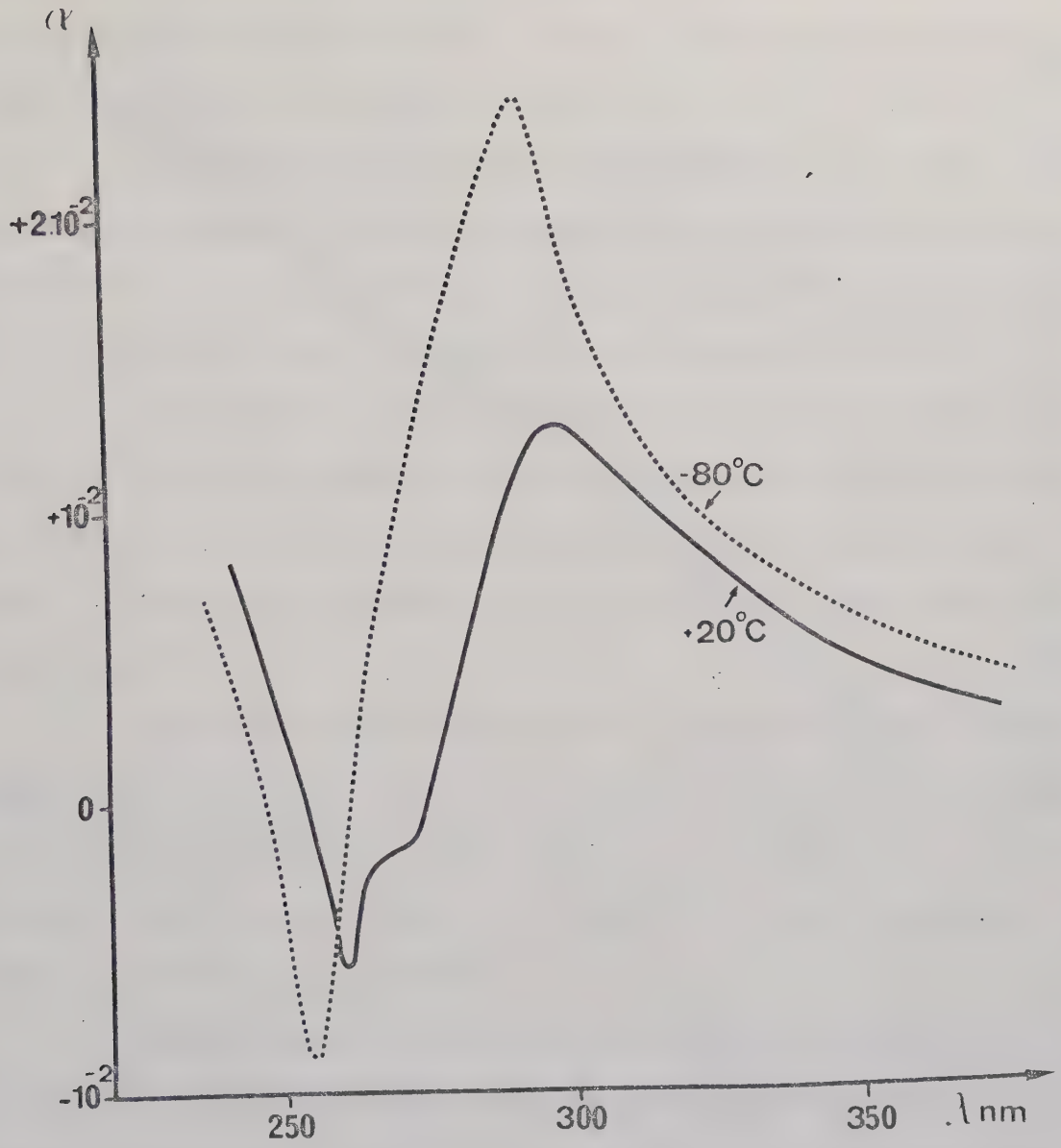


FIGURE 43 : Spectres de dispersion rotatoire, pour différentes températures et dans 70% de méthanol de l'ADN méthylé (80% des résidus guaniliques) (A_{260} =1.83).

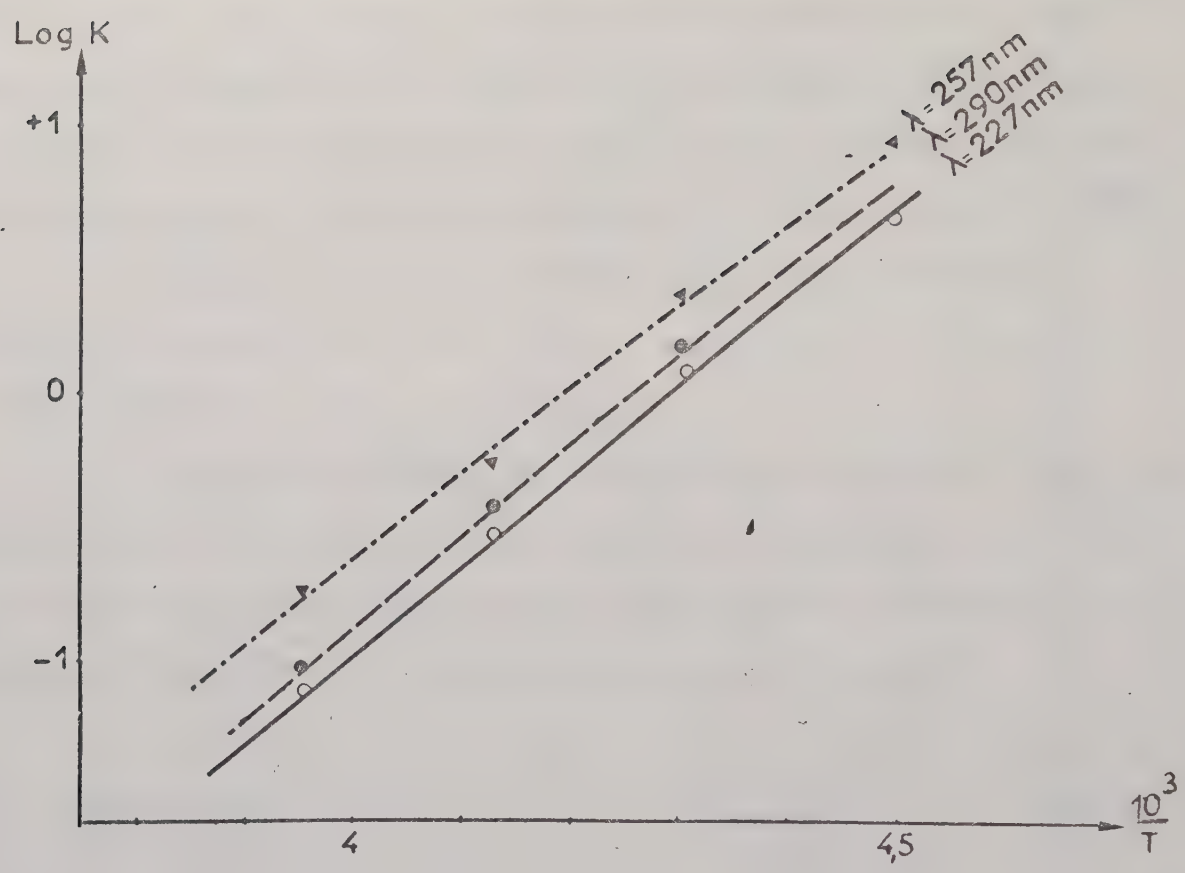


FIGURE 44 : Représentation de Van't Hoff (LogK en fonction de 1/T) de la constante d'équilibre K entre la forme B et la forme β d'ap les résultats de la figure 38.

que nous appellerons forme β . Cette propriété est tout à fait spécifique de l'ADN et non du tRNA.

La transition s'opère progressivement au fur et à mesure que diminue la température, par déplacement de l'équilibre $B \rightleftharpoons \beta$, ce point de vue étant compatible avec le fait qu'il existe un point de rotation constante à 273 nm.

La constante d'équilibre est donnée par $K = (\alpha - \alpha_B)/(\alpha_\beta - \alpha)$ où α représente la rotation à la température T, α_B la rotation à température ordinaire (ADN entièrement sous forme B) et α_β la rotation pour $T < -80°C$ (ADN entièrement sous forme β).

Reprenant les résultats de la figure 38 on a représenté sur la figure 44 log K en fonction de 1/T. On constate que cette représentation est linéaire en accord avec la loi de Van't Hoff : $d \log K/dT = - \Delta H/RT^2$ et l'on obtient la valeur $\Delta H = 6,5$ Kcal/mole.

Le problème qui se pose est double : quelle est cette nouvelle structure à basse température et quelle est la cause de ce changement ? Avec la seule technique de spectropolarimétrie il est évidemment difficile de répondre à ces questions, nous pouvons cependant faire des comparaisons intéressantes avec des phénomènes déjà connus.

2. Analogies avec d'autres phénomènes .

Lorsque l'ADN se trouve en présence d'un contenu ionique particulièrement élevé, par exemple 1 à 5 M en LiCl (61) le début de notre transition décrite précédemment est

observé comme représenté sur la figure 45. Nous notons également un point de rotation constante vers 277 nm contre 273 nm dans notre cas. Nous avons déjà noté dans le cas des polynucleotides l'analogie qui existe, quant aux effets, entre l'augmentation de force ionique et l'addition de methanol conjuguée à l'abaissement de la température.

Les nucleohistones reconstitués à partir de l'ADN et de polypeptides basiques, en particulier la poly Lysine, présentent un effet Cotton propre à l'ADN très proche de celui observé dans nos conditions (62)(63) (figure 46). Ce fait et celui évoqué précédemment ne sont peut être pas sans rapport, en effet : la reconstitution de nucleohistones se fait en présence de concentrations salines importantes (2 M NaCl)(64) et on peut alors supposer que la structure apparaissant dans ces conditions est nécessaire à la formation du complexe ADN-polypeptide qui fixe alors la structure. Partant de ce fait, nous avons essayé, à basse température, de reconstituer ces nucleohistones en introduisant dans la solution d'acide nucleique la poly Lysine, lorsque l'ADN est supposé possèder la structure favorable, une remontée en température permettant éventuellement d'obtenir le complexe à température ordinaire. Cette expérience n'a pas réussi cependant on peut toujours envisagé que la basse température, bien qu'elle apporte une condition stériquement favorable, inhibe la fixation du polypeptide sur l'ADN. Un point intéressant est à remarquer : l'ADN et la poly Lysine à basse température ne précipitent pas cependant

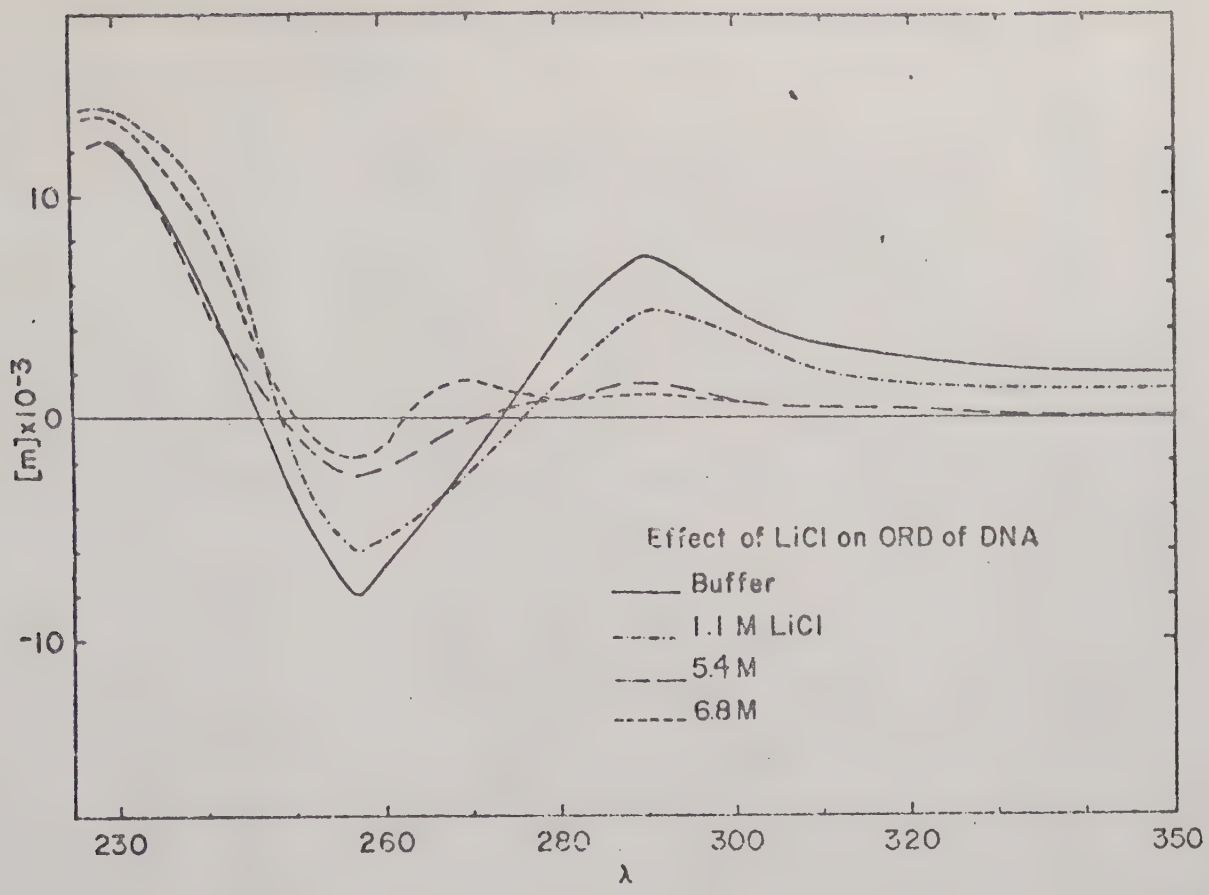


FIGURE 45 : Effet de fortes concentrations salines sur la dispersion rotatoire de l'ADN de thymus de veau d'après TUNIS et coll. (61).

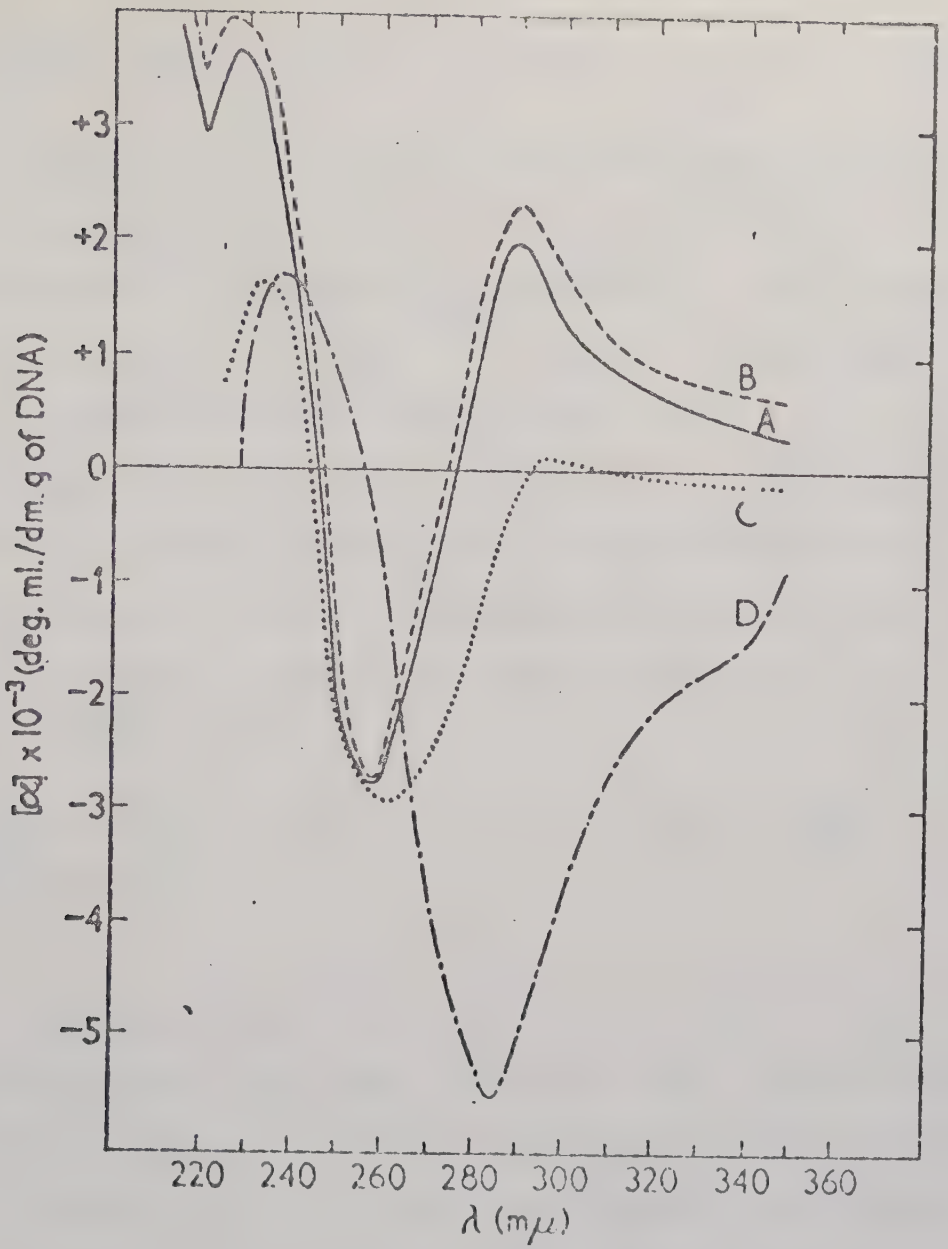


FIGURE 46 : Courbes différentielles de dispersion rotatoire de complexes poly lysine-ADN par rapport à la poly Lysine seule pour différents rapports poly Lysine/ADN : A(0), B(0.1) C(0.25) et D(0.5). D'après COHEN et coll. (62).

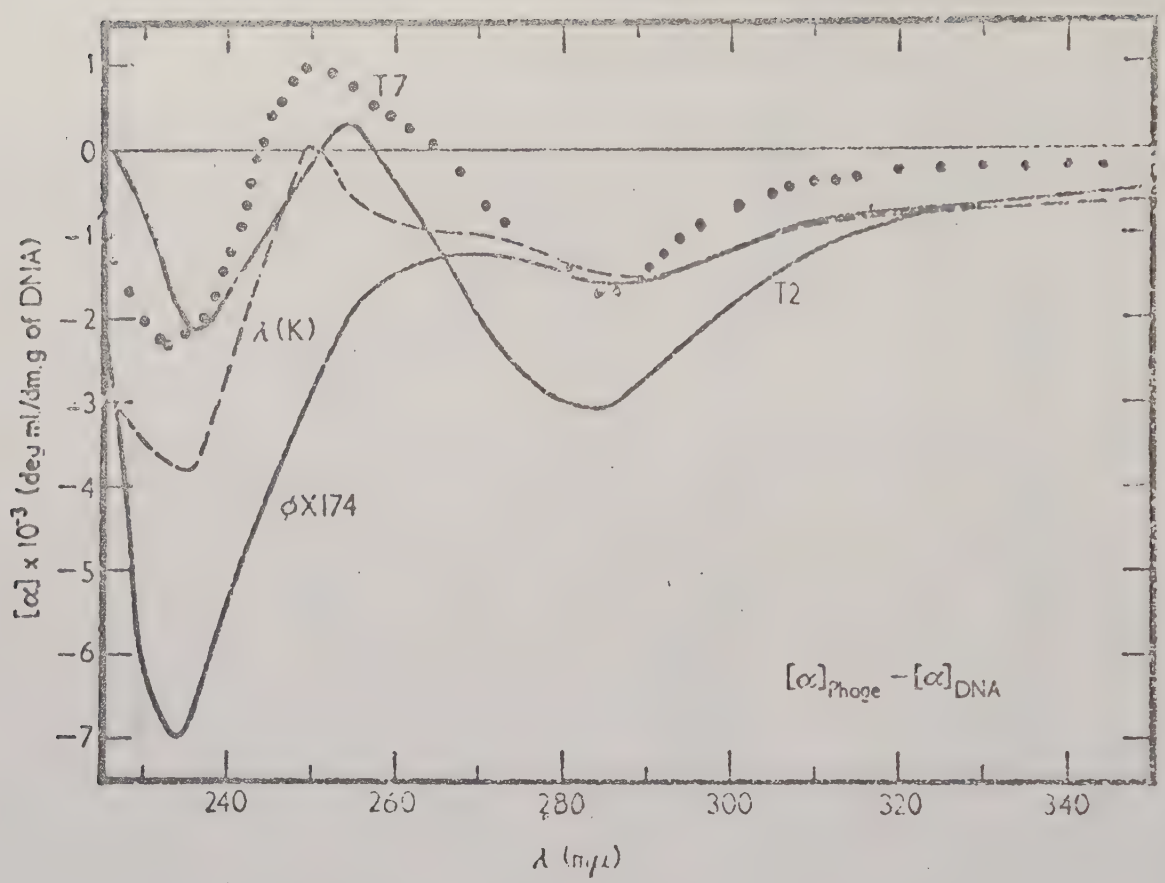


FIGURE 47 : Spectres différentiels de dispersion rotatoire entre l'ADN de certains virus et l'ADN libre. Chaque courbe correspond à un virus T_2, T_x, λ(K) et φX174. D'après MAESTRE et TINOCO (65).

qu'à température ordinaire ce phénomène se produit.

MAESTRE et TINOCO (65) ont étudié la dispersion rotatoire de l'ADN de plusieurs virus et pour certains, en particulier le virus T_2, l'effet Cotton propre à l'ADN (déduction faite de la gaine protéique) est proche de celui obtenu à basse température dans 70 % de methanol (Fig. 47).

Ainsi ces analogies montrent que la structure ? n'est probablement pas une curiosité due à nos conditions bien particulières mais correspond vraisemblablement à une forme présentant un intérêt certain peut être proche de celle de l'ADN in vivo.

3. Interprétation .

L'exploitation théorique de la courbe de dispersion de molécules aussi complexes que celle d'ADN est évidemment difficile. Il serait de ce fait simpliste de dire, que l'inversion de l'effet Cotton est du à une inversion du sens de l'hélice, car nous ne disposons d'aucun élément pour appuyer ou rejeter cette hypothèse.

Dans les phénomènes décrits précédemment qui présentent des analogies avec celui que nous avons observé, l'hypothèse la plus couramment admise est une modification de la gaine d'hydratation de l'ADN qui provoque une rotation des bases par rapport à l'axe de l'hélice. Nous retiendrons également cette hypothèse comme la plus probable dans nos conditions.

On peut évidemment penser à un passage de la forme usuelle B à la forme A observée lors de la deshydratation de fibres d'ADN (66). Mais cette hypothèse a été rejetée (67) car l'hybride ARN-ADN possèdant la structure A, même en présence d'humidité élevée a un effet Cotton en solution analogue à la forme B de l'ADN. Cependant les deux conditions d'observation (fibres et solution aqueuse) ne permettent peut être pas de rejeter complètement cette possibilité. Il est intéressant de remarquer que l'actinomycine qui empêche la transformation B ⟶ A (58) inhibe également le passage B ⟶ /? , montrant que si les transitions ne sont pas identiques, elles doivent vraisemblablement résulter de mécanismes voisins.

La diminution de la température en présence d'une forte quantité de methanol pourrait déterminer un changement dans la gaine d'hydratation de l'ADN. Dans le cas de l'ADN methylé ce même effet redonnerait à la molécule une structure identique à l'ADN initial dont la methylation avait un peu modifié la structure.

A la vue des résultats exposés dans les chapitres précédents on ne peut écarter l'hypothèse d'une agrégation progressive des molécules en fonction de l'abaissement de température entraînant un changement de structure comme cela était le cas pour l'acide polyglutamique. Cet aspect n'est pas une contradiction avec le précédent : en effet une agrégation procédant par liaison hydrophobe entraîne certainement un changement

notable de la gaine d'hydratation. Le compromis que l'on doit adopter entre une valeur détectable de la rotation et une absorption suffisamment faible pour ne pas "aveugler" l'appareil ne permet pas de faire varier la concentration dans une large gamme comme nous l'avons fait pour l'acide polyglutamique et le poly U.

L'hypothèse d'une agrégation n'est pas à écarter dans le cas des nucleohistones car il arrive fréquemment que ceux-ci précipitent. D'autre part une étude (68) a montré que des cations divalents à faible concentration donnent une courbe de dispersion présentant une ressemblance certaine avec celle qui nous intéresse, or il est bien connu que des cations divalents peuvent créer des ponts entre les brins polynucleotides conduisant à une agrégation.

En conclusion, nous dirons que la structure β, présentant une analogie spectrale avec les nucleohistones, peut résulter de la rotation des bases par rapport à l'axe de l'hélice du fait de la modification de la gaine d'hydratation, ce phénomène pouvant être le résultat d'une agrégation.

-=-=-=-=-=-=-=-

RESUME - CONCLUSION

1- A la suite d'expériences préliminaires réalisées en ordre principal dans notre Laboratoire et qui avaient pour but d'établir des conditions d'expérimentation physico-chimique de biopolymères dans des solutions hydro-organiques fluides aux basses températures, nous avons mis au point un équipement spécial permettant d'effectuer des mesures spectropolarimétriques entre + 80°C et - 100°C. En dehors des études présentées ici ce dispositif a permis d'enregistrer les courbes de dispersion rotatoire optique de certains complexes intervenant lors de réactions enzymatiques (5). Seules les températures très inférieures à 0°C permettent de stabiliser ces complexes, condition nécessaire pour que la spectropolarimétrie soit opérante puisque l'enregistrement des spectres correspondants est particulièrement lent.

2- En solution dans 70 % de methanol et à température ordinaire l'acide poly glutamique passe d'une forme structurée hélicoïdale (à bas pH) à une forme étirée (à pH élevé). Nous avons établi cette "transition" en corrigeant l'activité protonique de la présence du solvant organique.

Par rapport à la solution aqueuse le phénomène dominant semble être un changement de pK du polymère entraînant un déplacement de la valeur du pH de transition sans changer la nature de celle-ci.

Toujours dans 70 % de methanol les formes hélicoïdales à pH acide s'agrègent lorsqu'on abaisse la température et présentent un phénomène d'hystérèsis.

Lorsqu'on opère à pH basique, le poly Glu est dépourvu de structure hélicoïdale, l'abaissement de température dans 70 % de methanol entraîne une agrégation qui donne à la molécule un pourcentage d'hélicité élevé. Ce phénomène disparaît aux faibles concentrations. L'agrégation impose à cette structure non thermodynamiquement stable un état de contrainte dont la métastabilité semble responsable du cycle d'hystérèsis observé.

3- Le comportement des polynucleotides dépend essentiellement du type de structure secondaire qu'ils sont susceptibles de présenter :

- Les structures à simple brin, aussi bien en hélice simple (poly A à pH neutre) qu'en épingle a cheveux (polynucleotides alternés poly AU et AT) s'avèrent relativement peu sensibles à l'addition de methanol et ne donnent aucun phénomène particulier à basse température.
- Par contre le poly U en présence de 50 % de methanol et à faible force ionique s'organise bien en dessous de 0°C et nous pensons avoir montré qu'une continuité existe avec le phénomène observé dans les conditions classiques en solution aqueuse.

5- Nous considérons les expériences qui ont été présentées et discutées comme préliminaires et leur approfondissement puis leur généralisation supposent à notre avis les réalisations préalables suivantes :

a) Prise en considération d'autres paramètres que ceux que nous avons envisagés comme associés à la température, introduction d'autres solvants organiques, intervention d'autres techniques d'étude des conformations que la spectrophotométrie, la spectropolarimétrie qui ont été utilisées en ordre principal.

b) Etude d'autres polymères que ceux que nous avons expérimentés, même si le choix de ces derniers fut guidé par leur caractère représentatif d'une espèce donnée.

6- Ces indispensables réserves formulées, il nous paraît que l'expérimentation des macromolécules hélicoïdales dans des solvants hydro-organiques fluides aux basses températures ("antigels") ouvre des perspectives intéressantes en physicochimie macromoléculaire :

La diminution d'entropie observée dans nos conditions "inusuelles" facilite les interactions et donc les associations intermoléculaires, faisant apparaître des effets de concentration et des phénomènes afférents vraiment typiques des conditions choisies.

A première vue, ces conditions (de solvant et de température) peuvent paraître totalement artificielles et dangereuses, et il va de soi que l'on doit interpréter toute observation avec prudence et discernement. Mais outre qu'elles débouchent sur des phénomènes instructifs, on n'oubliera pas qu'à propos du travail sur le DNA sont apparues des transitions et une structure qui n'étaient pas sans rappeler des observations pratiquées dans des conditions très différentes, voire physiologiques.

-=-=-=-=-=-=-

- BIBLIOGRAPHIE -

1- A. BIELSKI et S. FREED., Biochim. Biophys. Acta., 1964, 89, 314.

2- S. FREED, Science 1965, 150, 576.

3- T. SHIGA, M. LAYANI et P. DOUZOU., Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 507.

4- R. BANERJEE, P. DOUZOU et A. LOMBARD., Nature, 1968, 217,23.

5- P. DOUZOU, R. SIREIX et F. TRAVERS, Proc. Natl. Ac. Sc. U.S. 1970, 66, 787.

6- P. DOUZOU., Biochimie, 1971, 53, 17.

7- P. DOUZOU, Biochimie, 1971, 53, 307.

8- F. TRAVERS et P. DOUZOU., J. Phys. Chem., 1970, 74 , 2243.

9- F. TRAVERS et M.P. DEBEY, C.R. Acad. Sc. Paris, 1969, 268 D, 1650.

10- F. TRAVERS, M.P. DEBEY, P. DOUZOU et A.M. MICHELSON, Biochim. Biophys. Acta, 1969, 194, 265.

11- F. TRAVERS, P. DOUZOU et A.M. MICHELSON., Biochim. Biophys. Acta, 1970, 199, 29.

12- F. TRAVERS, P. DOUZOU et A.M. MICHELSON., Biochim. Biophys. Acta, 1970, 217, 1.

13- F. TRAVERS et E. COUPECHOUX - Biochimie 1972.

14- C. BALNY, G. HUI BON HOA et F. TRAVERS, J. Chim. Phys. 1971, 68, 366.

15- M.P. DEBEY., Thèse 3° Cycle, Paris 1970.

16- G. AKERLOFF., J. Amer. Chem. Soc., 1932, 54, 4125.

17- P. DOUZOU., J. Chim. Phys., 1968, 65, 167.

18- B.E. CONWAY et R.G. BARRADAS : "Chemical Physics of Ionic Solutions"., John WILEY and Son. Ed. N.Y., 1966, p. 212.

19- G. HUI BON HOA et P. DOUZOU, 1972 en préparation.

20- R. SHEDLOVSKY et R.L. KAY, J. Phys. Chem., 1956, 60, 151.

21- P. CRABBE., Applications de la dispersion rotatoire optique et du dichroïsme circulaire en chimie organique, Gauthier-Villars., ed, Paris, 1968.

22- W. MOFFIT et J.T. YANG., Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 1956, 42, 596.

23- P.J. FLORY et T.G. Fox., J. Amer. Chem. Soc., 1951, 73, 1904.

24- P. DOTY, J.T. YANG et E.R. BLOUT, J. Polymer. Sc. 1957, 23, 851.

25- J.Y. CASSIM et E.W. TAYLOR.,Biophys. J., 1965, 5, 573.

26- B.R. JENNINGS, G. SPACH et T.M. SCHUSTER., Biopolymers, 1968, 6, 635.

27- M.L. TIFFANY et S. KRIMM., Biopolymers, 1968, 6, 1379.

28- M.L. TIFFANY et S. KRIMM, Biopolymers, 1969, 8, 347.

29- R. GABORIAUD, C.R. Acad. Sc. Paris, 1966, 263 C, 911.

30- W. KAUZMANN, Advan. Protein. Chem., 1959, 14, 1.

31- O. SINANOGLU et S. ABDULNUR., Fed. Proc., 1965. Suppl. n° 15.

32- G. HUI BON HOA et C. BALNY, J. Chim. Phys., 1969, 66,1528.

33- F. LETERRIER et P. DOUZOU., C.R. Acad. Sc. Paris, 1967, 265 C, 1205.

34- A. KATCHALSKI et A. OPLATKA, Israël, J. Med. Sci., 1966, 2, 4.

35- P.K. SARKAR et P. DOTY., Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 1966, 55, 981.

36- A.M. MICHELSON, J. MASSOULIE et W. GUSCHLBAUER., Advan. Nucleic. Acid. Res., 1967, 6, 83.

37- M. GRUNBERG, MANAGO., Advan. Nucleic. Acid. Res., 1963, 1, 93.

38- M. CHAMBERLIN, R.L. BALDWIN et P. BERG., J. Mol. Biol., 1963, 7, 334.

39- J.R. FRESCO., J. Mol. Biol., 1959, 1, 106.

40- J.R. FRESCO et E. KLEMPERER., Ann. N.Y. Acad. Sc., 1959, 81, 730.

41- R.F. STEINER et R.F. BEERS., Biochim. Biophys. Acta., 1959, 32, 166.

42- M. LENG et G. FELSENFELD., J. Mol. Biol., 1966, 15, 455.

43- MM. WARSHAW et I. TINOCO., J. Mol. Biol., 1966, 13, 54.

44- J. BRAHMS., A.M. MICHELSON et K.E. VAN HOLDE., J. Mol. Biol. 1966, 15, 467.

45- M. LIPSETT., Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 1960, 46, 445.

46- R.A. BROWN., Arch. Biochem. Biophys., 1966, 115, 102.

47- J.C. THRIERR et M. LENG., Biochim. Biophys. Acta., 1969, 182, 575.

48- D.B. MILLAR et M. MACKENZIE., Biochim. Biophys. Acta, 1970, 204, 82.

49- R.C. WARNER., J. Biol. Chem., 1957, 229, 314.

50- G. FELSENFELD et A. RICH., Biochim. Biophys. Acta., 1957, 26, 457.

51- J. MASSOULIE., European. J. Biochem., 1968, 3, 428.

52- R.B. INMAN et R.L. BALDWIN., J. Mol. Biol., 1962, 5, 172.

53- M. CHAMBERLIN, R.L. BALDWIN., J. Mol. Biol., 1964, 8, 52.

54- T.T. HERSKOVITS, S.J. SINGER et E.P. GEIDUSCHEK, Arch. Biochem. Biophys., 1961, 94, 99.

55- E.P. GEIDUSCHEK et T.T. HERSKOVITS., Arch. Biochem. Biophys. 1961, 95, 114.

56- E. REICH, A.M. FRANKLIN, A.J. SHATKIN et E.L. TATUM, Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 1962, 48, 1238.

57- L.D. HAMILTON, W. FULLER et E. REICH, Nature 1963, 198, 538.

58- E. REICH, Science 1964, 143, 684.

59- F. POCHON, P. BROOKES et A.M. MICHELSON, Eur. J. Biochem., 1971, 21, 154.

60- F. POCHON et A.M. MICHELSON, Biochim. Biophys. Acta, 1967, 149, 99.

61- M.J.B. TUNIS et J.E. HEARST, Biopolymers, 1968, 6, 1218.

62- P. COHEN et C. KIDSON, J. Mol. Biol., 1968, 35, 241.

63- J. SPONAR, M. BOUBLIK, I. FRIC et Z. SORMOVA., Biochim. Biophys. Acta., 1969, 209, 532.

64- R.C.C. HUANG, J. BONNER et K. MURRAY, J. Mol. Biol., 1964, 8, 54.

65- M.F. MAESTRE et I. TINOCO., J. Mol. Biol.,1967, 23, 323.

66- R. LANGRIDGE, D.A. MARVIN, W.E. SEEDS, H.R. WILSON, C.W. HOOPER, M.H.F. WILKINS et L.D. HAMILTON, J. Mol. Biol.,1960, 2, 38.

67- G. MILMAN, R. LANGRIDGE et M. CHAMBERLIN, Proc. Nat. Acad. Sc. U.S., 1967, 57, 1804.

68- P. CHENG, Biochim. Biophys. Acta., 1965, 102, 314.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1

CHAPITRE 1 : EXPERIMENTATION 6

I LES SOLVANTS MIXTES AUX BASSES TEMPERATURES

1-Masse volumique 6

2-Viscosité 6

3-Constante diélectrique 7

4-Activité protonique 10

4-a) définition

4-b) détermination

4-c) utilisation d'un pHmètre

5-La force ionique 15

II LES MESURES SPECTROSCOPIQUES AUX BASSES TEMPERATURES

1-Spectrophotométrie 16

2-Spectropolarimétrie 17

2-a) généralités

2-b) exploitation des spectres

2-c) spectropolarimètre

2-d) équipement aux basses températures

III VISCOSIMETRIE 27

CHAPITRE 2 : LES POLYPEPTIDES 30

I LES SOLUTIONS 31

II LE POLY GLU A TEMPERATURE ORDINAIRE EN PRESENCE DE METHANOL

1-Résultats 32

2-Discussion 33

III LE POLY GLU A PH < 6 ET A BASSE TEMPERATURE

1-Résultats 35

2-Discussion 36

IV LE POLY GLU A PH > 8 ET A BASSE TEMPERATURE

1-Résultats 39

1-a) description du phénomène

1-b) étude de la viscosité

1-c) influence du paH

1-d) influence de la concentration

1-e) influence du solvant

2-Discussion. 48

2-a) interprétation

2-b) nature des liaisons mises en jeu

2-c) le cycle d'hysterese

V AUTRES POLYPEPTIDES 55

CHAPITRE 3 : LES POLYNUCLEOTIDES 59

I LES SOLUTIONS 60

II RESULTATS ET DISCUSSION

1-Etude du poly A 62

1a) comportement en solution aqueuse

1-b) comportement en présence de méthanol

2-Etude du poly U 64

2-a) influence du méthanol

2-b) influence du contenu ionique

2-c) influence de la concentration

3-Etude du poly T 76

4-Etude de complexes entre polynucléotides 82

4-a) complexes entre poly A et poly U

4-b) complexes entre poly A et poly T

5-Comportement des copolymeres altérnés 84

CHAPITRE 4 : LES ACIDES NUCLEIQUES 88

I RESULTATS

1-L'ADN à température ordinaire 89

2-L'ADN à basse température 92

3-Etude de complexes de l'ADN 96

3-a) complexe ADN-Actinomycine

3-b) complexe ADN-méthylbenzanthracène

3-c) ADN méthylé

II DISCUSSION

1-Existence d'une nouvelle structure à basse température . 103

2-Analogies avec d'autres phénomènes 106

3-Interprétation 111

RESUME-CONCLUSION 114

BIBLIOGRAPHIE 119